



ic data: JP2004501340 (A) — 2004-01-15

Espacenet

Inventor(s):

Applicant(s):

international:

Classification:

- European:

*C07H21/00; C12M1/00; C12N15/09;
C12Q1/68; G01N21/78; G01N27/04;
G01N33/483; G01N33/53;
G01N33/566; G01N33/58; G01N37/00;
B82B1/00; C07B61/00; (IPC1-
7): C12M1/00; C12N15/09; C12Q1/68;
G01N21/78; G01N27/04; G01N33/483;
G01N33/53; G01N33/566; G01N33/58;
G01N37/00*

*B82Y15/00; B82Y30/00; C07H21/00;
C12Q1/68B10; C12Q1/68B10A;
C12Q1/68B2; C12Q1/68B10;
C12Q1/68B10; C12Q1/68B10;
C12Q1/68B10A; C12Q1/68B2;
C12Q1/68B2H; C12Q1/68B6*

**Application
number:**

JP20010551239T 20010112

**Priority
number(s):**

US20000176409P 20000113; US20000200161P 20000426;
US20000603830 20000626; US20010760500 20010112;
WO2001US01190 20010112

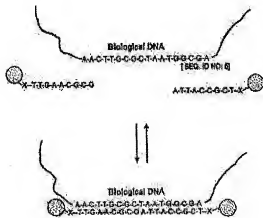
**Also
published as:**

WO0151665 (A2) WO0151665 (A9) WO0151665 (A3)
WO0151665 (A9) EP1294930 (A2) more

**Abstract not available for JP2004501340
(A)**

**Abstract of corresponding document:
WO0151665 (A2)**

The invention provides methods of detecting a nucleic acid. The methods comprise contacting the nucleic acid with one or more types of particles having oligonucleotides attached thereto. In one embodiment of the method, the oligonucleotides are attached to nanoparticles and have sequences complementary to portions of the sequence of the nucleic acid. A detectable change (preferably a color change) is brought about as a result of the hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to the nucleic acid. The invention also provides compositions and kits comprising particles. The invention further provides methods of synthesizing unique nanoparticle-oligonucleotide conjugates, the conjugates produced by the methods, and methods of using the conjugates. In addition, the invention provides nanomaterials and nanostructures comprising nanoparticles and methods of nanofabrication utilizing nanoparticles. Finally, the invention provides a method of separating a selected nucleic acid from other nucleic acids.



Last updated: 5.12.2011 Worldwide Database 5.7.31; 93p

(19) 日本国特許庁 (JP)

(12) 公表特許公報 (A)

(11) 特許出願公表番号

特表2004-501340

(P2004-501340A)

(43) 公表日 平成16年1月15日 (2004.1.15)

(51) Int. Cl. 7	F I	テーマコード (参考)
G O 1 N 33/53	G O 1 N 33/53	M 2 G O 4 5
C 1 2 M 1/00	C 1 2 M 1/00	A 2 G O 5 4
C 1 2 N 15/08	C 1 2 Q 1/68	A 2 G O 6 0
C 1 2 Q 1/68	G O 1 N 21/78	C 4 B O 2 4
G O 1 N 21/78	G O 1 N 27/04	Z 4 B O 2 9
	審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 735 頁) 最終頁に続く	

- (21) 出願番号 特願2001-551239 (P2001-551239)
 (86) (22) 出願日 平成13年1月12日 (2001.1.12)
 (85) 翻訳文提出日 平成14年7月11日 (2002.7.11)
 (86) 国際出願番号 PCT/US2001/001190
 (87) 国際公開番号 W02001/051665
 (87) 国際公開日 平成13年7月19日 (2001.7.19)
 (31) 優先権主張番号 60/176,409
 (32) 優先日 平成12年1月13日 (2000.1.13)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 60/200,161
 (32) 優先日 平成12年4月26日 (2000.4.26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)
 (31) 優先権主張番号 09/603,830
 (32) 優先日 平成12年6月26日 (2000.6.26)
 (33) 優先権主張国 米国 (US)

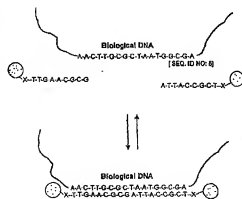
- (71) 出願人 501216012
 ナノスフェア インコーポレイテッド
 NANOSPHERE INC.
 アメリカ合衆国 60062 イリノイ州
 ノースブルック スコーキィ プルバード 1818 スイート 200
 (74) 代理人 100068755
 弁理士 恩田 博宣
 100105957
 弁理士 恩田 誠
 (72) 発明者 マーキン、チャド エイ.
 アメリカ合衆国 60091 イリノイ州
 ウィルメット シックスティーン ス
 トリート 111

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子とその使用方法

(57) 【要約】

本発明は核酸の検出方法を提供する。該方法は、核酸を、オリゴヌクレオチドを付着した1または複数種類の粒子と接触させることから成る。該方法の1実施形態では、オリゴヌクレオチドがナノ粒子に取り付けられ、核酸の配列の一部と相補的な配列を有する。ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが核酸に対してハイブリダイズした結果として、検出可能な変化 (好ましくは色の変化) が生じる。本発明は粒子を含む組成物およびキットも提供する。本発明はさらに、独自のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体の合成方法、該方法によって得られた共役体、該共役体の使用方法も提供する。その上、本発明はナノ粒子を含むナノ材料およびナノ構造とナノ粒子を使用したナノファブリケーションの方法を提供する。最後に、本発明は選択核酸を他の核酸から分離する方法を提供する。



【特許請求の範囲】

【請求項 1】

少なくとも 2 つの部分と有する核酸を検出する方法であって、オリゴヌクレオチドを付着したある種類のナノ粒子を提供するステップであって、各ナノ粒子上の該オリゴヌクレオチドが核酸の少なくとも 2 つの部分の配列に相補的な配列を有するステップと、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを核酸の 2 つ以上の部分と有効にハイブリダイズさせる条件下で、核酸とナノ粒子を接触させるステップと、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸とのハイブリダイゼーションによって起こる検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

10

【請求項 2】

少なくとも 2 つの部分と有する核酸を検出する方法であって、核酸を、オリゴヌクレオチドを付着した少なくとも 2 種類のナノ粒子と接触させるステップであって、第 1 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは該核酸の配列の第 1 部分に相補的な配列を有し、第 2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは核酸の配列の第 2 部分に相補的な配列を有し、前記接触が、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸とのハイブリダイゼーションによって起こる検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

20

【請求項 3】

前記接触条件には凍結と融解が含まれる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 4】

前記接触条件には加熱が含まれる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 5】

検出可能な変化は固体表面上で観察される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 6】

検出可能な変化は肉眼で観察可能な色の変化である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 7】

色の変化が固体表面上で観察される、請求項 6 に記載の方法。

【請求項 8】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項 2 に記載の方法。

30

【請求項 9】

ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの、ナノ粒子に付着していない端部が、核酸とのナノ粒子上のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションに基づいて検出可能な変化を生成する分子によって標識される、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 10】

ナノ粒子が金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子であり、ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは蛍光分子で標識される、請求項 9 に記載の方法。

【請求項 11】

核酸は第 1 部分と第 2 部分の間に位置する第 3 部分を有し、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列は、核酸の該第 3 部分に相補的な配列を有さず、核酸を、核酸の該第 3 部分に相補的な配列を有するフィラーオリゴヌクレオチドとさらに接触させ、前記接触が、フィラーオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる、請求項 2 に記載の方法。

40

【請求項 12】

核酸がウイルス RNA またはウイルス DNA である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 13】

核酸が疾患関連遺伝子である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 14】

核酸が細菌 DNA である、請求項 2 に記載の方法。

50

【請求項 15】

核酸が真菌 DNA である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 16】

核酸が合成 DNA、合成 RNA、構造的に修飾された天然または合成 RNA、もしくは構造的に修飾された天然または合成 DNA である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 17】

核酸が生物源のものである、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 18】

核酸がポリメラーゼ連鎖反応増幅法の産物である、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 19】

核酸を第 1 および第 2 種類のナノ粒子と同時に接触させる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 20】

核酸を、第 2 種類のナノ粒子と接触させる前に、第 1 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと接触およびハイブリダイズさせる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 21】

第 1 種類のナノ粒子が基板に付着される、請求項 20 に記載の方法。

【請求項 22】

核酸が二本鎖であり、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって三本鎖複合体が生じる、請求項 2 に記載の方法。

【請求項 23】

少なくとも 2 つの部分有する核酸を検出する方法であって、第 1 種類のナノ粒子を付着させた基板を提供するステップであって、該ナノ粒子にはオリゴヌクレオチドが付着しており、該オリゴヌクレオチドは検出すべき核酸の配列の第 1 部分に相補的な配列を有するステップと、

前記核酸を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で、基板に付着されたナノ粒子と接触させるステップと、オリゴヌクレオチドを付着した第 2 種類のナノ粒子を提供するステップであって、該オリゴヌクレオチドが、前記核酸の配列の 1 または複数の他の部分に相補的な配列を有するステップと、

基板に結び付けられた前記核酸分子を、第 2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で、第 2 種類のナノ粒子と接触させるステップと、

検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項 24】

基板には、1 つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のナノ粒子が付着されている、請求項 23 に記載の方法。

【請求項 25】

少なくとも 2 つの部分有する核酸を検出する方法であって、第 1 種類のナノ粒子を付着させた基板を提供するステップであって、該ナノ粒子にはオリゴヌクレオチドが付着し、該オリゴヌクレオチドは検出すべき核酸の配列の第 1 部分に相補的な配列を有するステップと、

前記核酸を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で、基板に付着されたナノ粒子と接触させるステップと、オリゴヌクレオチドを付着した第 2 種類のナノ粒子を提供するステップであって、該オリゴヌクレオチドが、前記核酸の配列の 1 または複数の他の部分に相補的な配列を有するステップと、

前記基板に結び付けられた核酸を、第 2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で、第 2 種類のナノ粒子と接触させるステップと

10

20

30

40

50

少なくとも2つの部分を有する選択配列を有する結合オリゴヌクレオチドを提供するステップであって、その第1部分は、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的であるステップと、

結合オリゴヌクレオチドを、結合オリゴヌクレオチドをナノ粒子上のオリゴヌクレオチドに対して有効にハイブリダイズさせる条件下で、基板に結び付けられた第2種類のナノ粒子と接触させるステップと、

オリゴヌクレオチドを付着した第3種類のナノ粒子を提供するステップであって、該オリゴヌクレオチドは結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列に相補的な配列を有するステップと、

第3種類のナノ粒子を、結合オリゴヌクレオチドをナノ粒子上のオリゴヌクレオチドに対して有効にハイブリダイズさせる条件下で、基板に結び付けられた結合オリゴヌクレオチドと接触させるステップと、

検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項26】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のナノ粒子が付着されている、請求項25に記載の方法。

【請求項27】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、

検出すべき核酸を、オリゴヌクレオチドを付着させた基板と接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、前記接触が、基板上のオリゴヌクレオチドを前記核酸に有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

基板に結び付けられた前記核酸を、1または複数の種類のオリゴヌクレオチドを付着した第1種類のナノ粒子と接触させるステップであって、該1または複数の種類のオリゴヌクレオチドの少なくとも1種類は前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、前記接触が、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

基板に結び付けられた第1種類のナノ粒子を、オリゴヌクレオチドを付着した第2種類のナノ粒子と接触させるステップであって、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、第1種類のナノ粒子上の該1または複数の種類のオリゴヌクレオチドのうちの1種類の配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有し、前記接触が、第1および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項28】

第1種類のナノ粒子には、1種類のためのオリゴヌクレオチドが付着しており、該オリゴヌクレオチドは、前記核酸の配列の第2部分および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する、請求項27に記載の方法。

【請求項29】

基板に結び付けられた第2種類のナノ粒子を第1種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記接触が、第1および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップからさらに成る、請求項28に記載の方法。

【請求項30】

第1種類のナノ粒子には、少なくとも2種類のオリゴヌクレオチドが付着しており、第1種類のオリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、第2種類のオリゴヌクレオチドは第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部分の配列に相補的な配列を有する、請求項27に記載の方法。

【請求項31】

基板に結び付けられた第2種類のナノ粒子を、第1種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記接触第1および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイ

ブリダイズさせる条件下で接触させるステップからさらに成る、請求項 30 に記載の方法。

【請求項 32】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着されている、請求項 27 に記載の方法。

【請求項 33】

基板が透明な基板または不透明な白色基板である、請求項 23～32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 34】

検出可能な変化は基板上における暗色領域の形成である、請求項 33 に記載の方法。

【請求項 35】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項 23～32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 36】

基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成する、請求項 23～32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 37】

検出可能な変化は光学式スキャナで観察される、請求項 23～32 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 38】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、検出すべき核酸を、オリゴヌクレオチドを付着させた基板と接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、前記接触が、基板上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

基板に結び付けられた前記核酸を、オリゴヌクレオチドを付着したある種類のナノ粒子と接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、前記接触が、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

基板を銀染料と接触させて、検出可能な変化を生成するステップと、

検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項 39】

ナノ粒子が貴金属から形成されている、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 40】

ナノ粒子が金または銀から形成されている、請求項 39 に記載の方法。

【請求項 41】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着されている、請求項 38 に記載の方法。

【請求項 42】

検出可能な変化は光学式スキャナで観察される、請求項 38～41 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 43】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、検出すべき核酸を、オリゴヌクレオチドを付着した基板と接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、前記接触が、基板上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、前記基板に結び付けられた核酸を、オリゴヌクレオチドを付着したリボソームと接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の一部に相補的な配列を

10

20

30

40

50

有し、前記接触が、リボソーム上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、
基板に結び付けられたリボソームを、少なくとも第1種類のオリゴヌクレオチドを付着した第1種類のナノ粒子と接触させるステップであって、該第1種類のオリゴヌクレオチドの、ナノ粒子に付着していない端部には、疎水基が付けられ、前記接触が、疎水の相互作用の結果としてナノ粒子上のオリゴヌクレオチドがリボソームへ付着するのを可能にするに有効な条件下で起こるステップと、
検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項44】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、
検出すべき核酸を、オリゴヌクレオチドを付着させた基板と接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、前記接触は、基板上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、
前記基板に結び付けられた核酸を、オリゴヌクレオチドを付着したリボソームと接触させるステップであって、オリゴヌクレオチドは、前記核酸の配列の一部分に相補的な配列を有し、前記接触は、リボソーム上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、
前記基板に結び付けられたリボソームを、少なくとも1つの第1種類のオリゴヌクレオチドを付着した第1種類のナノ粒子と接触させるステップであって、該第1種類のオリゴヌクレオチドの、ナノ粒子に付着していない端部には、疎水基が付けられ、前記接触が、疎水の相互作用の結果としてナノ粒子上のオリゴヌクレオチドがリボソームに付着するのを可能にするに有効な条件下で起こるステップと、
リボソームに結び付けられた第1種類のナノ粒子を、オリゴヌクレオチドを付着した第2種類のナノ粒子と接触させるステップであって、
第1種類のナノ粒子には、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する第2種類のオリゴヌクレオチドが付着し、
第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、第1種類のナノ粒子上の第2種類のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有し、
前記接触は、第1および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、
検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項45】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着されている、請求項43または44に記載の方法。

【請求項46】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項43または44に記載の方法。

【請求項47】

基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成する、請求項43または44に記載の方法。

【請求項48】

検出可能な変化は光学式スキャナで観察される、請求項43または44のいずれか一項に記載の方法。

【請求項49】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、
第1種類のナノ粒子を付着させた基板を提供するステップであって、該ナノ粒子にはオリゴヌクレオチドが付着しており、該オリゴヌクレオチドは検出すべき核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するステップと、
前記核酸を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる

10

20

30

40

50

条件下で、基板に付着されたナノ粒子と接触させるステップと、オリゴヌクレオチドを付着した少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体ブローブを提供するステップであって、該凝集体ブローブのナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体ブローブの該少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着しているステップと、基板に結び付けられた前記核酸分子を、凝集体ブローブ上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で、凝集体ブローブと接触させるステップと、検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項50】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のナノ粒子が付着されている、請求項49に記載の方法。

【請求項51】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、オリゴヌクレオチドを付着させた基板を提供するステップであって、該オリゴヌクレオチドは検出すべき核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するステップと、オリゴヌクレオチドを付着した少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体ブローブを提供するステップと、該凝集体ブローブのナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体ブローブの該少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着しているステップと、前記核酸、基板、および凝集体ブローブを、前記核酸を凝集体ブローブ上のオリゴヌクレオチドおよび基板上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項52】

前記核酸が基板上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように前記核酸を基板と接触させ、その後、前記核酸が凝集体ブローブ上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように基板に結び付けられた前記核酸を前記凝集体ブローブと接触させる、請求項51に記載の方法。

【請求項53】

前記核酸が凝集体ブローブ上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように前記核酸を凝集体ブローブと接触させ、その後、前記核酸が基板上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように前記核酸を基板と接触させる、請求項51に記載の方法。

【請求項54】

前記核酸を凝集体ブローブおよび基板と同時に接触させる、請求項51に記載の方法。

【請求項55】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着されている、請求項51に記載の方法。

【請求項56】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、オリゴヌクレオチドを付着させた基板を提供するステップと、オリゴヌクレオチドを付着した少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体ブローブを提供するステップであって、該凝集体ブローブのナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体ブローブの該少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、検出すべき核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着しているステップと、少なくとも2種類のオリゴヌクレオチドを付着したある種類のナノ粒子を提供するステッ

10

20

30

40

50

ブであって、第1種類のオリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、第2種類のオリゴヌクレオチドは基板に付着されたオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有するステップと、前記核酸、凝集体ブロープ、ナノ粒子、および基板を接触させるステップであって、前記接触が、凝集体ブロープ上およびナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせ、かつナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを基板上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項57】

前記核酸が凝集体ブロープ上のオリゴヌクレオチドおよびナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように前記核酸を凝集体ブロープおよびナノ粒子と接触させ、その後、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが基板上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように凝集体ブロープおよびナノ粒子に結び付けられた前記核酸を基板と接触させる、請求項56に記載の方法。

【請求項58】

前記核酸が凝集体ブロープ上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように前記核酸を凝集体ブロープと接触させ、その後、前記核酸がナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように、凝集体ブロープに結び付けられた前記核酸をナノ粒子上と接触させ、その後、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが基板上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように、凝集体ブロープおよびナノ粒子に結び付けられた前記核酸を基板と接触させる、請求項56に記載の方法。

【請求項59】

前記核酸が凝集体ブロープ上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように前記核酸を凝集体ブロープと接触させ、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが基板上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするようにナノ粒子を基板と接触させ、その後、前記核酸がナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように凝集体ブロープに結び付けられた前記核酸をナノ粒子と接触させる、請求項56に記載の方法。

【請求項60】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着されている、請求項56に記載の方法。

【請求項61】

基板が透明な基板または不透明な白色基板である、請求項49～60のいずれか一項に記載の方法。

【請求項62】

検出可能な変化は基板上における暗色領域の形成である、請求項61に記載の方法。

【請求項63】

凝集体ブロープのナノ粒子が金から形成されている、請求項49～60のいずれか一項に記載の方法。

【請求項64】

基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成する、請求項49～60のいずれか一項に記載の方法。

【請求項65】

検出可能な変化は光学式スキャナで観察される、請求項49～60のいずれか一項に記載の方法。

【請求項66】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、検出すべき核酸を、オリゴヌクレオチドを付着させた基板と接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、前記接触が、基板上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる

ステップと、

基板に結び付けた前記核酸を、オリゴヌクレオチドを付着したリボソームと接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の部分に相補的な配列を有し、前記接触は、リボソーム上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

オリゴヌクレオチドを付着した少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体ブロープを提供するステップであって、該凝集体ブロープのナノ粒子はそれに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体ブロープの該少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、ナノ粒子に付着していない端部に疎水基を有するオリゴヌクレオチドが付けられ、

疎水的相互作用の結果として、凝集体ブロープ上のオリゴヌクレオチドをリボソームへ付着するのを可能にするのに有効な条件下で、基板に結び付けられたリボソームを凝集体ブロープと接触させるステップと、

検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項67】

凝集体ブロープのナノ粒子が金から形成されている、請求項66に記載の方法。

【請求項68】

基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成する、請求項66に記載の方法。

【請求項69】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着されている、請求項66に記載の方法。

【請求項70】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、オリゴヌクレオチドを有する基板を提供するステップであって、該オリゴヌクレオチドは検出すべき核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するステップと、

少なくとも2種類のナノ粒子を有するコアブロープを提供するステップであって、各種類のナノ粒子には、他の種類のナノ粒子の少なくとも1種の上のオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドが付着しており、凝集体ブロープのナノ粒子は、それらに付着したオリゴヌクレオチドがハイブリダイズした結果互いに結び付けられるステップと、

2種類のオリゴヌクレオチドを付着したある種類のナノ粒子を提供するステップであって、第1種類のオリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、第2種類のオリゴヌクレオチドは、前記コアブロープの該少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類に付着したオリゴヌクレオチドの配列の一部に相補的な配列を有するステップと、

前記核酸、ナノ粒子、基板、およびコアブロープを、前記核酸をナノ粒子上のオリゴヌクレオチドおよび基板上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせ、かつナノ粒子上のオリゴヌクレオチドをコアブロープ上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、

検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項71】

核酸が基板上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように前記核酸を基板と接触させ、前記核酸がナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように基板に結び付けられた前記核酸をナノ粒子と接触させ、コアブロープ上のオリゴヌクレオチドがナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように前記核酸に結び付けられたナノ粒子をコアブロープと接触させる、請求項70に記載の方法。

【請求項72】

前記核酸がナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように前記核酸をナノ粒子と接触させ、その後、前記核酸が基板上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするようにナノ粒子に結び付けられた前記核酸を基板と接触させ、コアブロープ上のオリゴヌ

10

20

30

40

50

クレオチドがナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするように、前記核酸に結び付けられたナノ粒子をコアプローブと接触させる、請求項 70 に記載の方法。

【請求項 73】

少なくとも 2 つの部分に有する核酸を検出する方法であって、オリゴヌクレオチドを付着させた基板を提供するステップであって、該オリゴヌクレオチドは検出すべき核酸の配列の第 1 部分に相補的な配列を有するステップと、少なくとも 2 種類のナノ粒子を有するコアプローブを提供するステップであって、各種類のナノ粒子には、少なくとも 1 つの他の種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドが付着しており、凝集体プローブのナノ粒子が、それらに付着したオリゴヌクレオチドがハイブリダイズした結果互いに結び付けられるステップと、前記核酸の配列の第 2 部分に相補的な配列と、コアプローブの該少なくとも 2 種類のナノ粒子の少なくとも 1 種類に付着したオリゴヌクレオチドの配列の一部に相補的な配列を含む、ある種類の連結オリゴヌクレオチドを提供するステップと、前記核酸、連結オリゴヌクレオチド、基板、およびコアプローブを、前記核酸を連結オリゴヌクレオチドおよび基板上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせ、かつ連結オリゴヌクレオチド上のオリゴヌクレオチドをコアプローブ上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項 74】

基板には、1 つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着されている、請求項 70 ～ 73 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 75】

基板が透明な基板または不透明な白色基板である、請求項 70 ～ 73 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 76】

検出可能な変化は基板上における暗色領域の形成である、請求項 76 に記載の方法。

【請求項 77】

コアプローブのナノ粒子が金から形成されている、請求項 70 ～ 73 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 78】

基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成する、請求項 70 ～ 73 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 79】

検出可能な変化は光学式スキャナで観察される、請求項 70 ～ 73 のいずれか一項に記載の方法。

【請求項 80】

少なくとも 2 つの部分に有する核酸を検出する方法であって、オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を提供するステップと、1 または複数の種類の結合オリゴヌクレオチドを提供するステップであって、各結合オリゴヌクレオチドは 2 つの部分に有し、その一方の部分の配列は、核酸の複数の部分のうちの 1 つの配列に相補的であり、他方の部分の配列は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的であるステップと、ナノ粒子および結合オリゴヌクレオチドを、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを結合オリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、核酸および結合オリゴヌクレオチドを、結合オリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項 81】

核酸と接触させるに先立って、ナノ粒子を結合オリゴヌクレオチドと接触させる、請求項

10

20

30

40

50

80に記載の方法。

【請求項82】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を提供するステップと、
1または複数の結合オリゴヌクレオチドを提供するステップであって、各結合オリゴヌクレオチドは2つの部分を有し、その一方の部分の配列は、核酸の少なくとも2つの部分の配列に相補的であり、他方の部分の配列は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的であるステップと、
ナノ粒子および結合オリゴヌクレオチドを、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを結合オリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、
核酸および結合オリゴヌクレオチドを、結合オリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、
検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

10

【請求項83】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、
核酸を、オリゴヌクレオチドを付着した少なくとも2種類の粒子と接触させるステップであって、
第1種類の粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第1部分に相補的な配列が有し、エネルギー供与体で標識されており、
第2種類の粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第2部分に相補的な配列が有し、エネルギー受容体で標識されており、
前記接触が、粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、
粒子上のオリゴヌクレオチドの核酸とのハイブリダイゼーションによって起こる検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

20

【請求項84】

エネルギー供与体および受容体が蛍光分子である、請求項83に記載の方法。

【請求項85】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、
オリゴヌクレオチドを付着したある種類のマイクロスフェアを提供するステップであって、該オリゴヌクレオチドは核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、かつ蛍光分子で標識されているステップと、
オリゴヌクレオチドを付着したある種類のナノ粒子を提供するステップであって、該オリゴヌクレオチドは核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、該ナノ粒子は検出可能な変化を生成可能であるステップと、
核酸を、マイクロスフェアおよびナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを該核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で、マイクロスフェアおよびナノ粒子と接触させるステップと、
蛍光の変化、ナノ粒子によって生成される別の検出可能な変化、またはその両方を観察するステップと、から成る方法。

30

40

【請求項86】

ナノ粒子によって生成される検出可能な変化が色の変化である、請求項85に記載の方法。

【請求項87】

マイクロスフェアがラテックスマイクロスフェアであり、ナノ粒子が金ナノ粒子であり、蛍光、色または両方の変化を観察する、請求項85に記載の方法。

【請求項88】

ラテックスマイクロスフェア、ナノ粒子および核酸の混合物の一部を、微孔質材料に位置する観察領域に配置し、観察領域から非結合の金ナノ粒子を取り除くために微孔質材料を処理し、その後、蛍光、色、または両方の変化を観察するステップからさらに成る、請

50

請求項 87 に記載の方法。

【請求項 89】

少なくとも 2 つの部分有する核酸を検出する方法であって、オリゴヌクレオチドを付着した第 1 種類の金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子を提供するステップであって、該オリゴヌクレオチドは核酸の配列の第 1 部分に相補的な配列を有し、蛍光分子で標識されているステップと、オリゴヌクレオチドを付着した第 2 種類の金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子を提供するステップであって、該オリゴヌクレオチドは核酸の配列の第 2 部分に相補的な配列を有し、蛍光分子で標識されているステップと、2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で核酸を前記 2 種類のナノ粒子と接触させるステップと、蛍光の変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項 90】

ナノ粒子および核酸の混合物の一部を、微孔質材料に位置する観察領域に配置し、観察領域から非結合のナノ粒子を取り除くために微孔質材料を処理し、その後、蛍光の変化を観察するステップからさらに成る、請求項 89 に記載の方法。

【請求項 91】

少なくとも 2 つの部分有する核酸を検出する方法であって、オリゴヌクレオチドを付着したある種類の粒子を提供するステップであって、該オリゴヌクレオチドが第 1 部分と第 2 部分を有し、両方の部分が核酸の配列の一部に相補的であるステップと、第 1 部分と第 2 部分を有するある種類のプローブオリゴヌクレオチドを提供するステップであって、該第 1 部分は、粒子に付着したオリゴヌクレオチドの前記第 1 部分に相補的な配列を有し、両部分は核酸の配列の一部に相補的であり、プローブオリゴヌクレオチドがさらにその一端でリポーター分子で標識されているステップと、粒子上のオリゴヌクレオチドをプローブオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で、粒子およびプローブオリゴヌクレオチドを接触させて、サテライトプローブを生成するステップと、その後、核酸をプローブオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で、サテライトプローブを核酸と接触させるステップと、粒子を取り除くステップと、リポーター分子を検出するステップと、から成る方法。

【請求項 92】

粒子が磁気粒子で、リポーター分子が蛍光分子である、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 93】

粒子が磁気粒子で、リポーター分子が染料分子である、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 94】

粒子が磁気粒子で、リポーター分子がレドックス活性分子である、請求項 91 に記載の方法。

【請求項 95】

少なくとも 1 つの容器を備えたキットであって、前記容器には前記オリゴヌクレオチドを付着した少なくとも 2 種類のナノ粒子を含む組成物が入っており、第 1 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは核酸の第 1 部分の配列に相補的な配列を有し、第 2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは核酸の第 2 部分の配列に相補的な配列を有する、キット。

【請求項 96】

容器中の組成物が、第 1 および第 2 部分間に位置する核酸の第 3 部分に相補的な配列を有するフィラーオリゴヌクレオチドをさらに含む、請求項 95 に記載のキット。

【請求項 97】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項 95 に記載のキット。

【請求項 98】

固体表面をさらに備えた、請求項 95 に記載のキット。

【請求項 99】

少なくとも 2 つの容器を備えたキットであって、

第 1 容器には、核酸の第 1 部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入っており、

第 2 容器には、核酸の第 2 部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入っている、キット。

【請求項 100】

第 1 および第 2 部分間に位置する核酸の第 3 部分に相補的な配列を有するフィラーオリゴヌクレオチドを保持する第 3 容器を備えた請求項 99 に記載のキット。

10

【請求項 101】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項 99 に記載のキット。

【請求項 102】

固体表面をさらに備えた、請求項 99 に記載のキット。

【請求項 103】

少なくとも 2 つの容器を備えたキットであって、

第 1 容器には、結合オリゴヌクレオチドの第 1 部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入っており、

第 2 容器には、第 1 部分がナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的であり第 2 部分が核酸の一部分の配列に相補的である、少なくとも 2 つの部分を含む配列を有する、1 または複数の種類の結合オリゴヌクレオチドが入っている、キット。

20

【請求項 104】

追加の容器を備え、該追加の容器の各々には追加的結合オリゴヌクレオチドが入っており、個々の追加的結合オリゴヌクレオチドは、第 1 部分がナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列と相補的であり第 2 部分が核酸の別の部分の配列に相補的である、少なくとも 2 つの部分を含む配列を有する、請求項 103 に記載のキット。

【請求項 105】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項 103 に記載のキット。

【請求項 106】

固体表面をさらに備えた、請求項 103 に記載のキット。

30

【請求項 107】

キットであって、

オリゴヌクレオチドを付着した 1 種類のナノ粒子と、第 1 部分がナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的であり、そのため結合オリゴヌクレオチドがナノ粒子上のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされるようになっており、第 2 部分が核酸の 1 または複数の部分の配列に相補的である少なくとも 2 つの部分を含む配列を各々が有する 1 または複数の種類の結合オリゴヌクレオチドが入った容器、を備えたキット。

【請求項 108】

少なくとも 1 つの容器を備え得たキットであって、該容器にはオリゴヌクレオチドを付着した金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子が入っており、該オリゴヌクレオチドは核酸の一部分に相補的な配列を有し、該オリゴヌクレオチドの、ナノ粒子に付着していない端部には蛍光分子が付けられている、キット。

40

【請求項 109】

キットであって、

核酸の第 1 部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を付着させた基板と、

核酸の第 2 部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入った第 1 容器と、を備えたキット。

【請求項 110】

第 1 部分が第 1 容器内のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相

50

補的である、少なくとも2つの部分を有する選択配列を有する結合オリゴヌクレオチドが入った第2容器と、

結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入った第3容器と、をさらに備えた請求項109に記載のキット。

【請求項111】

少なくとも3つの容器を備えたキットであって、

ナノ粒子が入った第1容器と、

核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有する第1オリゴヌクレオチドが入った第2容器と、

核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有する第2オリゴヌクレオチドが入った第3容器と、を備えたキット。 10

【請求項112】

第1および第2部分間に位置する核酸の第3部分の配列に相補的な配列を有する第3オリゴヌクレオチドが入った第4容器をさらに備えた、請求項111に記載のキット。

【請求項113】

基板をさらに備えた、請求項111に記載のキット。

【請求項114】

第1部分が第2オリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的である、少なくとも2つの部分を有する選択配列を有する結合オリゴヌクレオチドが入った第4容器と、結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが入った第5容器と、をさらに備えた請求項113に記載のキット。 20

【請求項115】

オリゴヌクレオチド、ナノ粒子、またはその両方が、オリゴヌクレオチドをナノ粒子へ付着するための官能基を担持している、請求項111に記載のキット。

【請求項116】

基板、ナノ粒子、またはその両方が、基板へナノ粒子を付着するための官能基を担持している、請求項113に記載のキット。

【請求項117】

基板にナノ粒子が付着されている、請求項113に記載のキット。

【請求項118】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項111に記載のキット。 30

【請求項119】

キットであって、

核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた基板と、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを一部に付着させたナノ粒子が入った第1容器と、

第1容器内のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入った第2容器と、を備えたキット。

【請求項120】

キットであって、

基板と、

ナノ粒子が入った第1容器と、

核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有する第1オリゴヌクレオチドが入った第2容器と、

核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有する第2オリゴヌクレオチドが入った第3容器と、

第2オリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する第3オリゴヌクレオチドが入った第4容器と、を備えたキット。

【請求項121】

オリゴヌクレオチド、ナノ粒子、基板、またはそれらすべてが、ナノ粒子へオリゴヌクレオチドを付着させるか、または基板へオリゴヌクレオチドを付着するための、官能基を担持している、請求項120に記載のキット。

【請求項122】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項120に記載のキット。

【請求項123】

キットであって、

核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた基板と、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着したリボソームが入った第1容器と、

少なくとも第1種類のオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入った第2容器であって前記第1種類のオリゴヌクレオチドの、ナノ粒子に付着していない端部には疎水基が付いている、第2容器と、を備えたキット。

【請求項124】

第2容器のナノ粒子には、第2の種類のオリゴヌクレオチドが付着しており、該第2種類のオリゴヌクレオチドは第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有し、

キットはさらに、

第1種類のナノ粒子上の第2種類のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた第2種類のナノ粒子が入った第3容器をさらに備える、請求項123に記載のキット。

【請求項125】

キットであって、

核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を付着させた基板と、

オリゴヌクレオチドを付着した少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体ブローブが入った第1容器であって、該凝集体ブローブのナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体ブローブの該少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している、第1容器と、を備えたキット。

【請求項126】

キットであって、

核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた基板と、オリゴヌクレオチドを付着した少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体ブローブが入った第1容器であって、該凝集体ブローブのナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体ブローブの該少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している、第1容器と、を備えたキット。

【請求項127】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着されている、請求項126に記載のキット。

【請求項128】

キットであって、

オリゴヌクレオチドを付着させた基板と、

オリゴヌクレオチドを付着した少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体ブローブが入った第1容器であって、凝集体ブローブのナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体ブローブの該少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している、第1容器と、

10

20

30

40

50

少なくとも２種類のオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入った第２容器であって、第１種類のオリゴヌクレオチドは核酸の配列の第２部分に相補的な配列を有し、第２種類のオリゴヌクレオチドは基板に付着させたオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する、第２容器と、を備えたキット。

【請求項１２９】

キットであって、

核酸の第１部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた基板と、核酸の第２部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着したリボソームが入った第１容器と、

オリゴヌクレオチドを付着した少なくとも２種類のナノ粒子を含む凝集体ブローブが入った第２容器であって、凝集体ブローブのナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体ブローブの該少なくとも２種類のナノ粒子の少なくとも１種類にはオリゴヌクレオチドが付着し、該オリゴヌクレオチドのナノ粒子に付着していない端部には、疎水基が付いている、第２容器と、を備えたキット。

【請求項１３０】

基板が透明な基板または不透明な白色基板である、請求項１２５～１２９いずれか一項に記載のキット。

【請求項１３１】

凝集体ブローブのナノ粒子が金から形成されている、請求項１２５～１２９いずれか一項に記載のキット。

【請求項１３２】

少なくとも３つの容器を備えたキットであって、

ナノ粒子が入った第１容器と、

核酸の第１部分の配列に相補的な配列を有する第１オリゴヌクレオチドが入った第２容器と、

核酸の第２部分の配列に相補的な配列を有する第２オリゴヌクレオチドが入った第３容器と、を備えたキット。

【請求項１３３】

第１部分と第２部分の間に位置する核酸の第３部分の配列に相補的な配列を有する第３オリゴヌクレオチドが入った第４容器をさらに備えた、請求項１３２に記載のキット。

【請求項１３４】

基板をさらに備えた。請求項１３２に記載のキット。

【請求項１３５】

第１部分が第２オリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的である、少なくとも２つの部分を有する選択配列を有する結合オリゴヌクレオチドが入った第４容器と、結合オリゴヌクレオチドの第２部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが入った第５容器と、をさらに備えた請求項１３４に記載のキット。

【請求項１３６】

オリゴヌクレオチド、ナノ粒子、またはその両方が、オリゴヌクレオチドをナノ粒子へ付着するための官能基を担持している、請求項１３２に記載のキット。

【請求項１３７】

基板、ナノ粒子、またはその両方が、基板へナノ粒子を付着するための官能基を担持している、請求項１３４に記載のキット。

【請求項１３８】

基板にナノ粒子が付着されている、請求項１３４に記載のキット。

【請求項１３９】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項１３２に記載のキット。

【請求項１４０】

キットであって、

核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた基板と、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを一部付着させたナノ粒子が入った第1容器と、第1容器内のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入った第2容器と、を備えたキット。

【請求項141】

キットであって、

基板と、

ナノ粒子が入った第1容器と、

核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有する第1オリゴヌクレオチドが入った第2容器と、

核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有する第2オリゴヌクレオチドが入った第3容器と、

第2オリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する第3オリゴヌクレオチドが入った第4容器と、を備えたキット。

【請求項142】

オリゴヌクレオチド、ナノ粒子、基板、またはそれらすべてが、ナノ粒子へオリゴヌクレオチドを付着させるか、または基板へオリゴヌクレオチドを付着するための、官能基を担持している、請求項141に記載のキット。

【請求項143】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項141に記載のキット。

【請求項144】

キットであって、

核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた基板と、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたりボソームが入った第1容器と、

少なくとも第1種類のオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入った第2容器であって、該第1種類のオリゴヌクレオチドの、ナノ粒子に付着していない端部には疎水基が付いている、第2容器と、を備えたキット。

【請求項145】

第2容器内のナノ粒子には、第2の種類のオリゴヌクレオチドが付着され、該第2種類のオリゴヌクレオチドは第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有し、

キットはさらに、

第1種類のナノ粒子上の第2種類のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた第2種類のナノ粒子が入った第3容器をさらに備える、請求項144に記載のキット。

【請求項146】

少なくとも2つの容器を備えたキットであって、

第1容器には、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有し、かつ粒子に付着していない端部がエネルギー供与体で標識されているオリゴヌクレオチドを付着させた粒子が入っており、

第2容器には、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有し、かつ粒子に付着していない端部がエネルギー受容体で標識されているオリゴヌクレオチドを付着させた粒子が入っている、キット。

【請求項147】

エネルギー供与体および受容体が蛍光分子である、請求項146に記載のキット。

【請求項148】

少なくとも1つの容器を備えたキットであって、前記容器には、核酸の第1部分の配列に

10

20

30

40

50

相補的な配列を有し、かつ該粒子に付着していない端部がエネルギー供与体で標識されているオリゴヌクレオチドを付着させた第1種類の粒子と、それに付けられた、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有し、かつ該粒子に付着していない端部がエネルギー受容体で標識されているオリゴヌクレオチドを付着させた第2種類の粒子とが入っている、キット。

【請求項149】

エネルギー供与体および受容体が蛍光分子である、請求項148に記載のキット。

【請求項150】

キットであって、

核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、かつ蛍光分子で標識されたオリゴヌクレオチドを付着させたマイクロスフェアが入った第1容器と、

核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたある種類のナノ粒子が入った第2容器と、を備えたキット。

【請求項151】

マイクロスフェアがラテックスマイクロスフェアであり、ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項150に記載のキット。

【請求項152】

微孔質材料をさらに備えた、請求項150に記載のキット。

【請求項153】

キットであって、

核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、かつ蛍光分子で標識されたオリゴヌクレオチドを付着させた第1種類の金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子が入った第1容器と、

核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、かつ蛍光分子で標識されたオリゴヌクレオチドを付着させた第2種類の金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子が入った第2容器と、を備えたキット。

【請求項154】

微孔質材料をさらに備えた、請求項153に記載のキット。

【請求項155】

サテライトプローブが入った容器を備えたキットであって、該サテライトプローブが、両部分が核酸の配列の一部分に相補的な配列を有する、第1部分および第2部分を有するオリゴヌクレオチドを付着させた粒子と、

第1部分および第2部分を有し、ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドにハイブリダイズし、さらにリポーター分子が一端に付いた、プローブオリゴヌクレオチドであって、該第1部分は粒子に付着した該オリゴヌクレオチドの第1部分の配列に相補的な配列を有し、両部分は核酸の配列の部分に相補的な配列を有するプローブオリゴヌクレオチドと、を含むキット。

【請求項156】

凝集体プローブが入った容器を備えたキットであって、凝集体プローブはオリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含み、該凝集体プローブのナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体プローブの該少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、核酸の配列の一部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している、キット。

【請求項157】

凝集体プローブが入った容器を備えたキットであって、凝集体プローブはオリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含み、該凝集体プローブのナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体プローブの該少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、ナノ粒子に付着していない端部に疎水基が付いたオリゴヌクレオチドが付着している、キット。

【請求項158】

凝集体プローブであって、該凝集体プローブはオリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも

も2種類のナノ粒子を含み、凝集体ブロープの該ナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体ブロープの該少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、核酸の配列の部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している、凝集体ブロープ。

【請求項159】

各々2種類のオリゴヌクレオチドを付着させた2種類のナノ粒子を含み、各種類のナノ粒子に付着した第1種類のオリゴヌクレオチドは、核酸の配列の一部分に相補的な配列を有し、第1種類のナノ粒子に付着した第2種類のオリゴヌクレオチドは、第2種類のナノ粒子に付着した第2種類のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する、請求項158に記載の凝集体ブロープ。

10

【請求項160】

オリゴヌクレオチドを付着させた3種類のナノ粒子を含み、第1種類のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは、第2種類のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有し、第2種類のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは、第1種類のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有し、第3種類のナノ粒子には2種類のオリゴヌクレオチドが付着しており、第1種類のオリゴヌクレオチドは核酸の配列の部分に相補的な配列を有し、第2種類のオリゴヌクレオチドは1番目または第2種類のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する、請求項158に記載の凝集体ブロープ。

20

【請求項161】

凝集体ブロープであって、該凝集体ブロープはオリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含み、凝集体ブロープのナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられ、凝集体ブロープの該少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類にはオリゴヌクレオチドが付着し、該オリゴヌクレオチドのナノ粒子に付着していない端部には、疎水基が付いている、凝集体ブロープ。

【請求項162】

コアブロープが入った容器を備えたキットであって、該コアブロープは、オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含み、コアブロープのナノ粒子は、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられている、キット。

30

【請求項163】

検出すべき核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた基板をさらに備えた、請求項162に記載のキット。

【請求項164】

2種類のオリゴヌクレオチドを付着させたある種類のナノ粒子が入った容器をさらに備え、第1種類のオリゴヌクレオチドは核酸の第2部分に相補的な配列を有し、第2種類のオリゴヌクレオチドは、コアブロープの前記少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類に付着したオリゴヌクレオチドの配列の一部分に相補的な配列を有する、請求項162または163に記載のキット。

40

【請求項165】

核酸の配列の第2部分に相補的な配列と、コアブロープの前記少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類に付着したオリゴヌクレオチドの配列の一部分に相補的な配列とを有するある種類の連結オリゴヌクレオチドが入った容器をさらに備えた、請求項162または163に記載のキット。

【請求項166】

オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含むコアブロープであって、コアブロープのナノ粒子が、それに付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果互いに結び付けられている、コアブロープ。

50

【請求項 167】

ナノ粒子を付着させた基板。

【請求項 168】

前記ナノ粒子には、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着している、請求項167に記載の基板。

【請求項 169】

オリゴヌクレオチドを付着した金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子であって、オリゴヌクレオチドのナノ粒子に付着していない端部が蛍光分子で標識されている、金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子。

【請求項 170】

サテライトプローブであって、

第1部分および第2部分を有し、かつ両部分が核酸の配列の部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた粒子と、
ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたプローブオリゴヌクレオチドであって、第1部分および第2部分を有し、第1部分は前記粒子に付着したオリゴヌクレオチドの第1部分の配列に相補的な配列を有し、両部分が核酸の配列の一部分に相補的な配列を有し、さらにリポーター分子が一端に付いた、プローブオリゴヌクレオチドと、を含むサテライトプローブ。

【請求項 171】

ナノファブリケーションの方法であって、

選択配列を有する少なくとも1種類の連結オリゴヌクレオチドを提供するステップであって、連結オリゴヌクレオチドの各種類の配列が少なくとも2つの部分を有するステップと

、
オリゴヌクレオチドを付着させた1または複数の種類のナノ粒子を提供するステップであって、各種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが連結オリゴヌクレオチドの部分の配列に相補的な配列を有するステップと、
連結オリゴヌクレオチドおよびナノ粒子を、ナノ粒子がオリゴヌクレオチドコネクタによって一緒に纏められた所望のナノ材料またはナノ構造が形成されるように、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを連結オリゴヌクレオチドへ有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、から成る方法。

【請求項 172】

オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子が提供され、第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、連結オリゴヌクレオチドの配列の第1部分に相補的な配列を有し、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、連結オリゴヌクレオチドの配列の第2部分に相補的な配列を有する、請求項171に記載の方法。

【請求項 173】

ナノ粒子は金属ナノ粒子、半導体ナノ粒子、またはそれらの組合せである、請求項171または172に記載の方法。

【請求項 174】

金属ナノ粒子は金から形成されており、半導体ナノ粒子はCdSe/ZnS（コア/シェル）から形成されている、請求項173に記載の方法。

【請求項 175】

ナノファブリケーションの方法であって、

オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を提供するステップであって、

第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有し、

第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有するステップと、

所望のナノ材料またはナノ構造が形成されるように、第1と第2種類のナノ粒子を、ナノ

10

20

30

40

50

粒子上のオリゴヌクレオチドを互いに有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、から成る方法。

【請求項 176】

ナノ粒子は金属のナノ粒子、半導体ナノ粒子、またはそれらの組合せである、請求項 175 に記載の方法。

【請求項 177】

金属ナノ粒子は金から形成されており、半導体ナノ粒子は CdSe/ZnS (コア/シェル) から形成されている、請求項 176 に記載の方法。

【請求項 178】

オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子から構成されたナノ材料またはナノ構造であって、ナノ粒子がオリゴヌクレオチドコネクタにより一緒に纏められている、ナノ材料またはナノ構造。 10

【請求項 179】

少なくともオリゴヌクレオチドコネクタの一部が三本鎖である、請求項 178 に記載のナノ材料またはナノ構造。

【請求項 180】

ナノ粒子は金属のナノ粒子、半導体ナノ粒子、またはそれらの組合せである、請求項 178 のナノ材料またはナノ構造。

【請求項 181】

金属ナノ粒子は金から形成されており、半導体ナノ粒子は CdSe/ZnS (コア/シェル) から形成されている、請求項 180 に記載のナノ材料またはナノ構造。 20

【請求項 182】

オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも 2 種類のナノ粒子を含む組成物であって、第 1 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の第 1 部分または連結オリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有し、第 2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の第 2 部分または連結オリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する、組成物。

【請求項 183】

ナノ粒子は金属のナノ粒子、半導体ナノ粒子、またはそれらの組合せである、請求項 182 に記載の組成物。

【請求項 184】

金属ナノ粒子は金から形成されており、半導体ナノ粒子は CdSe/ZnS (コア/シェル) から形成されている、請求項 183 に記載の組成物。 30

【請求項 185】

容器のアセンブリであって、

オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入った第 1 容器と、

オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入った第 2 容器とを備え、

第 1 容器内のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは、第 2 容器内のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有し、

第 2 容器内のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは、第 2 容器内のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する、アセンブリ。 40

【請求項 186】

ナノ粒子は金属のナノ粒子、半導体ナノ粒子、またはそれらの組合せである、請求項 185 のアセンブリ

【請求項 187】

金属ナノ粒子は金から形成されており、半導体ナノ粒子は CdSe/ZnS (コア/シェル) から形成されている、請求項 186 に記載のアセンブリ。

【請求項 188】

複数の異なるオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子。

【請求項 189】

少なくとも 2 つの部分有する選択核酸を、他の核酸から分離する方法であって、 50

オリゴヌクレオチドを付着させた2種類以上のナノ粒子を提供するステップであって、各種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、選択核酸の複数の部分のうちの1つの配列に相補的な配列を有するステップと、核酸およびナノ粒子を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを選択核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させ、その結果、選択核酸にハイブリダイズしたナノ粒子が凝集して沈降するようにするステップと、

【請求項190】

安定したナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するためにオリゴヌクレオチドを荷電ナノ粒子へ結合させる方法であって、ナノ粒子に結合可能な官能基を含む部分を共有結合で結合させた、オリゴヌクレオチドを提供するステップと、

少なくともオリゴヌクレオチドの一部がナノ粒子に結合するのに十分な期間、水中でオリゴヌクレオチドとナノ粒子を接触させるステップと、

該水へ少なくとも1つの塩を加えて塩溶液を作製するステップであって、該塩溶液のイオン強度は、ナノ粒子に対するオリゴヌクレオチドの静電引力または静電斥力、ならびに互いに対するオリゴヌクレオチドの静電斥力を少なくとも部分的に克服するのに十分な強度であるステップと、

追加オリゴヌクレオチドがナノ粒子に結合して、安定したナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するのに十分な追加期間、塩溶液中でオリゴヌクレオチドとナノ粒子を接触させるステップと、から成る方法。

【請求項191】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項190に記載の方法。

【請求項192】

ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項191に記載の方法。

【請求項193】

ナノ粒子に結合可能な官能基を含む部分がアルカンチオールである、請求項192に記載の方法。

【請求項194】

すべての塩が1回の追加で水に加えられる、請求項190に記載の方法。

【請求項195】

塩が時間の経過と共に徐々に加えられる、請求項190に記載の方法。

【請求項196】

前記塩は、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、アンモニア、塩化物、ナトリウム、酢酸塩、酢酸アンモニウム、これらの塩の2以上の組合せ、リン酸緩衝液中のこれらの塩の1つ、および、リン酸緩衝液中のこれらの塩の2以上の組合せから成る群から選択される、請求項190に記載の方法。

【請求項197】

前記塩がリン酸緩衝液中の塩化ナトリウムである、請求項196に記載の方法。

【請求項198】

少なくとも10ピコモル/ cm^2 の表面密度でナノ粒子表面に存在するオリゴヌクレオチドを有するナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体が生成される、請求項190に記載の方法。

【請求項199】

オリゴヌクレオチドが少なくとも15ピコモル/ cm^2 の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項198に記載の方法。

【請求項200】

オリゴヌクレオチドが約15ピコモル/ cm^2 ～約40ピコモル/ cm^2 の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項199に記載の方法。

【請求項201】

ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するためにオリゴヌクレオチドをナノ粒子へ

10

20

30

40

50

結合させる方法であって、

少なくとも1種類の認識オリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを提供するステップであって、各認識オリゴヌクレオチドがスパーサー部分と認識部分を有し、該スパーサー部分はナノ粒子に結合可能であるように設計されているステップと、認識オリゴヌクレオチドの少なくとも一部がナノ粒子に結合して、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するのに有効な条件下で、オリゴヌクレオチドおよびナノ粒子を接触させるステップと、から成る方法。

【請求項202】

認識オリゴヌクレオチドの各スパーサー部分には、ナノ粒子に結合可能な官能基を有する部分が共有結合によって結び付けられている、請求項201に記載の方法。

10

【請求項203】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項201に記載の方法。

【請求項204】

ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項203に記載の方法。

【請求項205】

スパーサー部分が少なくとも約10ヌクレオチドを含む、請求項204に記載の方法。

【請求項206】

スパーサー部分が約10〜約30のヌクレオチドを含む、請求項205に記載の方法。

【請求項207】

スパーサーのヌクレオチドの塩基が、すべてアデニン、すべてチミン、すべてシトシン、すべてウラシル、またはすべてグアニンである、請求項206に記載の方法。

20

【請求項208】

ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するためにオリゴヌクレオチドをナノ粒子へ結合させる方法であって、

ある種類の認識オリゴヌクレオチドと、ある種類の希釈剤オリゴヌクレオチドとを含む、オリゴヌクレオチドを提供するステップと、

前記オリゴヌクレオチドを前記ナノ粒子と、前記ある種類のオリゴヌクレオチドの各々の少なくとも一部がナノ粒子に結合して、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するために有効な条件下で、接触させるステップと、から成る方法。

【請求項209】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項208に記載の方法。

30

【請求項210】

ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項209に記載の方法。

【請求項211】

各認識オリゴヌクレオチドがスパーサー部分と認識部分を有し、該スパーサー部分はナノ粒子に結合可能であるように設計されている、請求項208に記載の方法。

【請求項212】

認識オリゴヌクレオチドの各スパーサー部分には、ナノ粒子に結合可能な官能基を有する部分が共有結合によって結び付けられている、請求項211に記載の方法。

【請求項213】

認識オリゴヌクレオチドのスパーサー部分が少なくとも約10ヌクレオチドを含む、請求項211に記載の方法。

40

【請求項214】

認識オリゴヌクレオチドのスパーサー部分が約10ヌクレオチド〜約30ヌクレオチドを含む、請求項213に記載の方法。

【請求項215】

スパーサーのヌクレオチドの塩基が、すべてアデニン、すべてチミン、すべてシトシン、すべてウラシル、またはすべてグアニンである、請求項211に記載の方法。

【請求項216】

希釈剤オリゴヌクレオチドが、認識オリゴヌクレオチドのスパーサー部分に含まれるのと

50

ほぼ同じ数のヌクレオチドを含む、請求項 2 1 1 に記載の方法。

【請求項 2 1 7】

希釈剤オリゴヌクレオチドの配列が、認識オリゴヌクレオチドのスパーサー部分の配列と同じである、請求項 2 1 6 に記載の方法。

【請求項 2 1 8】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 2 種類の認識オリゴヌクレオチドを含む、請求項 2 0 8 に記載の方法。

【請求項 2 1 9】

ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するためにオリゴヌクレオチドを荷電ナノ粒子へ結合させる方法であって、

ナノ粒子に結合可能な官能基を有する部分が共有結合によって結び付けられ、かつある種類の認識オリゴヌクレオチドと、ある種類の希釈剤オリゴヌクレオチドを含む、オリゴヌクレオチドを提供するステップと、

前記ある種類のオリゴヌクレオチドの各々の少なくとも一部がナノ粒子に結合するのに十分な期間、水中で該オリゴヌクレオチドをナノ粒子と接触させるステップと、

該水へ少なくとも 1 つの塩を加えて塩溶液を作製するステップであって、該塩溶液のイオン強度は、ナノ粒子に対するオリゴヌクレオチドの静電引力または静電斥力、ならびに互いに対するオリゴヌクレオチドの静電斥力を少なくとも部分的に克服するのに十分な強度であるステップと、

前記ある種類のオリゴヌクレオチドの各々の追加オリゴヌクレオチドがナノ粒子に結合して、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するのに十分な追加期間、塩溶液中でオリゴヌクレオチドとナノ粒子を接触させるステップと、から成る方法。

【請求項 2 2 0】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項 2 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2 1】

ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項 2 2 0 に記載の方法。

【請求項 2 2 2】

ナノ粒子に結合可能な官能基を含む部分がアルカンチオールである、請求項 2 2 1 に記載の方法。

【請求項 2 2 3】

すべての塩が 1 回の追加で水に加えられる、請求項 2 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2 4】

塩が時間の経過と共に徐々に加えられる、請求項 2 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2 5】

前記塩は、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、アンモニア、塩化物、ナトリウム、酢酸塩、酢酸アンモニウム、これらの塩の 2 以上の組合せ、リン酸緩衝液中のこれらの塩の 1 つ、および、リン酸緩衝液中のこれらの塩の 2 以上の組合せから成る群から選択される、請求項 2 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2 6】

前記塩がリン酸緩衝液中の塩化ナトリウムである、請求項 2 2 5 に記載の方法。

【請求項 2 2 7】

少なくとも $1.0 \text{ ピコモル} / \text{cm}^2$ の表面密度でナノ粒子表面に存在するオリゴヌクレオチドを有するナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体が生成される、請求項 2 1 9 に記載の方法。

【請求項 2 2 8】

オリゴヌクレオチドが少なくとも $1.5 \text{ ピコモル} / \text{cm}^2$ の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 2 2 7 に記載の方法。

【請求項 2 2 9】

オリゴヌクレオチドが約 $1.5 \text{ ピコモル} / \text{cm}^2$ ～約 $4.0 \text{ ピコモル} / \text{cm}^2$ の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 2 2 8 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 230】

各認識オリゴヌクレオチドがスパーサー部分と認識部分を有し、各スパーサー部分には、ナノ粒子に結合可能な官能基を有する部分が共有結合によって結び付けられている、請求項 219 に記載の方法。

【請求項 231】

スパーサー部分が少なくとも約 10 ヌクレオチドを含む、請求項 230 に記載の方法。

【請求項 232】

スパーサー部分が約 10 ～約 30 のヌクレオチドを含む、請求項 231 に記載の方法。

【請求項 233】

スパーサーのヌクレオチドの塩基が、すべてアデニン、すべてチミン、すべてシトシン、すべてウラシル、またはすべてグアニンである、請求項 230 に記載の方法。

【請求項 234】

希釈剤オリゴヌクレオチドが、認識オリゴヌクレオチドのスパーサー部分に含まれるのとはほぼ同じ数のヌクレオチドを含む、請求項 230 に記載の方法。

【請求項 235】

希釈剤オリゴヌクレオチドの配列が、認識オリゴヌクレオチドのスパーサー部分の配列と同じである、請求項 234 に記載の方法。

【請求項 236】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 2 種類の認識オリゴヌクレオチドを含む、請求項 219 に記載の方法。

【請求項 237】

オリゴヌクレオチドを付着したナノ粒子であるナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体であって、該オリゴヌクレオチドは共役体が安定であるように十分な表面密度でナノ粒子表面に存在し、該オリゴヌクレオチドの少なくとも一部は、核酸または別のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する、共役体。

【請求項 238】

オリゴヌクレオチドが少なくとも $10 \text{ ピコモル} / \text{cm}^2$ の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 237 に記載の共役体

【請求項 239】

オリゴヌクレオチドが少なくとも $15 \text{ ピコモル} / \text{cm}^2$ の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 238 に記載のナノ粒子。

【請求項 240】

オリゴヌクレオチドが約 $15 \text{ ピコモル} / \text{cm}^2 \sim$ 約 $40 \text{ ピコモル} / \text{cm}^2$ の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 239 に記載のナノ粒子。

【請求項 241】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項 237 に記載のナノ粒子。

【請求項 242】

ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項 241 に記載のナノ粒子。

【請求項 243】

オリゴヌクレオチドを有するナノ粒子であって、該オリゴヌクレオチドは少なくとも 1 種類の認識オリゴヌクレオチドを含み、該認識オリゴヌクレオチドの各々はスパーサー部分と認識部分を有し、該スパーサー部分はナノ粒子に結び付けられるように設計され、該認識部分は核酸または別のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する、ナノ粒子。

【請求項 244】

前記スパーサー部分が、ナノ粒子に共有結合で結び付けられる部分を有し、該部分は、スパーサー部分をナノ粒子に結び付ける官能基を含む、請求項 243 に記載のナノ粒子。

【請求項 245】

スパーサー部分が少なくとも約 10 ヌクレオチドを含む、請求項 243 に記載のナノ粒子

20

30

40

50

【請求項 246】

スパーサー部分が約 10 ～ 約 30 のヌクレオチドを含む、請求項 245 に記載のナノ粒子。

【請求項 247】

スパーサー部分のヌクレオチドの塩基が、すべてアデニン、すべてチミン、すべてシトシン、すべてウラシル、またはすべてグアニンである、請求項 243 に記載のナノ粒子。

【請求項 248】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 10 ピコモル / cm^2 の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 243 に記載のナノ粒子。

【請求項 249】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 15 ピコモル / cm^2 の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 248 に記載のナノ粒子。

【請求項 250】

オリゴヌクレオチドが約 15 ピコモル / cm^2 ～ 約 40 ピコモル / cm^2 の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 249 のナノ粒子。

【請求項 251】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項 243 に記載のナノ粒子。

【請求項 252】

ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項 251 に記載の方法。

【請求項 253】

オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子であって、該オリゴヌクレオチドが、核酸またはまたは別のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を各々が有する少なくとも 1 種類の認識オリゴヌクレオチドと、ある種類の希釈剤オリゴヌクレオチドと、を含む、ナノ粒子。

【請求項 254】

認識オリゴヌクレオチドの各々がスパーサー部分と認識部分を有し、該スパーサー部分はナノ粒子に結び付けられるように設計され、該認識部分は核酸または別のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する、請求項 253 に記載のナノ粒子。

【請求項 255】

前記スパーサー部分が、ナノ粒子に共有結合で結び付けられる部分を有し、該部分は、スパーサー部分をナノ粒子に結び付ける官能基を含む、請求項 254 に記載のナノ粒子。

【請求項 256】

スパーサー部分が少なくとも約 10 ヌクレオチドを含む、請求項 254 に記載のナノ粒子。

【請求項 257】

スパーサー部分が約 10 ～ 約 30 のヌクレオチドを含む、請求項 256 に記載のナノ粒子。

【請求項 258】

スパーサー部分のヌクレオチドの塩基が、すべてアデニン、すべてチミン、すべてシトシン、すべてウラシル、またはすべてグアニンである、請求項 254 に記載のナノ粒子。

【請求項 259】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 10 ピコモル / cm^2 の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 253 に記載のナノ粒子。

【請求項 260】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 15 ピコモル / cm^2 の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 259 に記載のナノ粒子。

【請求項 261】

オリゴヌクレオチドが約 15 ピコモル / cm^2 ～ 約 40 ピコモル / cm^2 の表面密度でナ

10

20

30

40

50

ノ粒子表面に存在する、請求項260に記載のナノ粒子。

【請求項262】

前記希釈剤オリゴヌクレオチドが、認識オリゴヌクレオチドのスペーサー部分に含まれるヌクレオチドとほぼ同じ数のヌクレオチドを含む、請求項254に記載のナノ粒子。

【請求項263】

希釈剤オリゴヌクレオチドの配列が認識オリゴヌクレオチドのスペーサー部分の配列と同じである、請求項262に記載のナノ粒子。

【請求項264】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項253に記載のナノ粒子。

【請求項265】

ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項264に記載のナノ粒子。

【請求項266】

核酸を検出する方法であって、

請求項237～242のいずれか一項に記載の少なくとも1種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を核酸を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、
ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸のハイブリダイゼーションによって起こる検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項267】

核酸を検出する方法であって、

請求項243～265のいずれか一項に記載の少なくとも1種類のナノ粒子と核酸を、ナノ粒子上の少なくとも1種類の認識オリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、
認識オリゴヌクレオチドと核酸のハイブリダイゼーションによって起こる検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項268】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、

請求項237～242のいずれか一項に記載のある種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を提供するステップであって、各ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の少なくとも2つの部分の配列に相補的な配列を有するステップと、
ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸の2つ以上の部分とを有効にハイブリダイズさせる条件下で、核酸と共役体を接触させるステップと、
ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸のハイブリダイゼーションによって起こる検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項269】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、

請求項237～240のいずれか一項に記載の少なくとも2種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を核酸と接触させるステップであって、第1種類の共役体のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは該核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、第2種類の共役体のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは該核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、前記接触は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを該核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸のハイブリダイゼーションによって起こる検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項270】

前記接触条件には凍結と融解が含まれる、請求項269に記載の方法。

【請求項271】

前記接触条件には加熱が含まれる、請求項269に記載の方法。

【請求項272】

検出可能な変化は固体表面上で観察される、請求項269に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 273】

検出可能な変化は肉眼で観察可能な色の変化である、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 274】

色の変化が固体表面上で観察される、請求項 273 に記載の方法。

【請求項 275】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 276】

ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 277】

ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの、ナノ粒子に付着していない端部が、核酸との
ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションに基づいて検出可能な変化を
生成する分子によって標識される、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 278】

ナノ粒子が金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子であり、ナノ粒子に付着したオリゴヌクレ
オチドは蛍光分子で標識される、請求項 277 に記載の方法。

【請求項 279】

核酸は第 1 部分と第 2 部分の間に位置する第 3 部分を有し、ナノ粒子上のオリゴヌクレオ
チドの配列は、核酸の該第 3 部分に相補的な配列を有せず、

核酸を、核酸の該第 3 部分に相補的な配列を有するフィラーオリゴヌクレオチドとさらに
接触させ、前記接触が、フィラーオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせ
る条件下で起こる、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 280】

核酸がウイルス RNA または DNA である、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 281】

核酸が疾患関連遺伝子である、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 282】

核酸が細菌 DNA である、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 283】

核酸が真菌 DNA である、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 284】

核酸が合成 DNA、合成 RNA、構造的に修飾された天然または合成 RNA、もしくは構
造的に修飾された天然または合成 DNA である、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 285】

核酸が生物源のものである、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 286】

核酸がポリメラーゼ連鎖反応増幅の産物である、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 287】

核酸を第 1 と第 2 種類の共役体と同時に接触させる、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 288】

核酸を、第 2 種類の共役体と接触させる前に、第 1 種類の共役体のナノ粒子上のオリゴ
ヌクレオチドと接触およびハイブリダイズさせる、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 289】

第 1 種類の共役体が基板に付着される、請求項 288 に記載の方法。

【請求項 290】

核酸が二本鎖であり、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによ
って三本鎖複合体が生じる、請求項 269 に記載の方法。

【請求項 291】

少なくとも 2 つの部分有する核酸を検出する方法であって、
認識オリゴヌクレオチドを付着させた請求項 243 ～ 252 のいずれか一項に記載の少な
くともある種類のナノ粒子を提供するステップであって、各ナノ粒子上の認識オリゴヌ
50

レオチドは核酸の少なくとも2つの部分の配列に相補的な配列を有するステップと、核酸とナノ粒子を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを核酸の2つ以上の部分と有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと
核酸とナノ粒子上のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションによって起こる検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項292】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、認識オリゴヌクレオチドを付着させた請求項243~250に記載のいずれか一項に記載の少なくとも2種類のナノ粒子と核酸を接触させるステップであって、第1種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドは核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、第2種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドは核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、前記接触が、ナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、
ナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドと核酸のハイブリダイゼーションによって起こる検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項293】

前記接触条件には凍結と融解が含まれる、請求項292に記載の方法。

【請求項294】

前記接触条件には加熱が含まれる、請求項292に記載の方法。

【請求項295】

検出可能な変化は固体表面上で観察される、請求項292に記載の方法。

【請求項296】

検出可能な変化は肉眼で観察可能な色の変化である、請求項292に記載の方法。

【請求項297】

色の変化が固体表面上で観察される、請求項296に記載の方法。

【請求項298】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項292に記載の方法。

【請求項299】

ナノ粒子が金から形成されている、請求項298に記載の方法。

【請求項300】

ナノ粒子に付着した認識オリゴヌクレオチドの、ナノ粒子に付着していない端部が、核酸とのナノ粒子上のオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションに基づいて検出可能な変化を生成する分子によって標識される、請求項292に記載の方法。

【請求項301】

ナノ粒子が金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子であり、ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは蛍光分子で標識される、請求項300に記載の方法。

【請求項302】

核酸は第1部分と第2部分の間に位置する第3部分を有し、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列は、核酸の該第3部分に相補的な配列を有せず、

核酸を、核酸の該第3部分に相補的な配列を有するフィラーオリゴヌクレオチドとともに接触させ、前記接触が、フィラーオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる、請求項292に記載の方法。

【請求項303】

核酸がウイルスRNAまたはDNAである、請求項292に記載の方法。

【請求項304】

核酸が疾患関連遺伝子である、請求項292に記載の方法。

【請求項305】

核酸が細菌DNAである、請求項292に記載の方法。

【請求項306】

核酸が真菌DNAである、請求項292に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 307】

核酸が合成 DNA、合成 RNA、構造的に修飾された天然または合成 RNA、もしくは構造的に修飾された天然または合成 DNA である、請求項 292 に記載の方法。

【請求項 308】

核酸が生物源のものである、請求項 292 に記載の方法。

【請求項 309】

核酸がポリメラーゼ連鎖反応増幅法の産物である、請求項 292 に記載の方法。

【請求項 310】

核酸を、第 1 および第 2 種類のナノ粒子と同時に接触させる、請求項 292 に記載の方法

10

【請求項 311】

核酸を、第 2 種類のナノ粒子と接触させる前に、第 1 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと接触およびハイブリダイズさせる、請求項 292 に記載の方法。

【請求項 312】

第 1 種類のナノ粒子が基板に付けられる、請求項 311 に記載の方法。

【請求項 313】

核酸が二本鎖であり、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって二本鎖複合体が生じる、請求項 292 に記載の方法。

【請求項 314】

少なくとも 2 つの部分有する核酸を検出する方法であって、
認識オリゴヌクレオチドを付着させた請求項 253～265 のいずれか一項に記載のある種類のナノ粒子を提供するステップであって、各ナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドは核酸の少なくとも 2 つの部分の配列に相補的な配列を有するステップと、
核酸とナノ粒子を、ナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドを核酸の 2 つ以上の部分と有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させるステップと、
ナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドと核酸のハイブリダイゼーションによって起こる検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

20

【請求項 315】

少なくとも 2 つの部分有する核酸を検出する方法であって、
認識オリゴヌクレオチドを付着させた請求項 253～263 のいずれか一項に記載の少なくとも 2 種類のナノ粒子を核酸と接触させるステップであって、第 1 種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドは核酸の配列の第 1 部分に相補的な配列を有し、第 2 種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドは核酸の配列の第 2 部分に相補的な配列を有し、前記接触が、ナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、
ナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドと核酸のハイブリダイゼーションによって起こる検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

30

【請求項 316】

前記接触条件には凍結と融解が含まれる、請求項 315 に記載の方法。

【請求項 317】

前記接触条件には加熱が含まれる、請求項 315 に記載の方法。

40

【請求項 318】

検出可能な変化は固体表面上で観察される、請求項 315 に記載の方法。

【請求項 319】

検出可能な変化は肉眼で観察可能な色の変化である、請求項 315 に記載の方法。

【請求項 320】

色の変化が固体表面上で観察される、請求項 319 に記載の方法。

【請求項 321】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項 315 に記載の方法。

【請求項 322】

50

ナノ粒子が金から形成されている、請求項 3 2 1 に記載の方法。

【請求項 3 2 3】

ナノ粒子に付着した認識オリゴヌクレオチドの、ナノ粒子に付着していない端部が、核酸とのナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションに基づいて検出可能な変化を生成する分子によって標識される、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 2 4】

ナノ粒子が金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子であり、ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは蛍光分子で標識される、請求項 3 2 3 に記載の方法。

【請求項 3 2 5】

核酸は第 1 部分と第 2 部分の間に位置する第 3 部分を有し、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列は、核酸の該第 3 部分に相補的な配列を有さず、核酸を、核酸の該第 3 部分に相補的な配列を有するフィラーオリゴヌクレオチドとさらに接触させ、前記接触が、フィラーオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 2 6】

核酸がウイルス RNA または DNA である、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 2 7】

核酸が疾患関連遺伝子である、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 2 8】

核酸が細菌 DNA である、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 2 9】

核酸が真菌 DNA である、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 3 0】

核酸が合成 DNA、合成 RNA、構造的に修飾された天然または合成 RNA、もしくは構造的に修飾された天然または合成 DNA である、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 3 1】

核酸が生物源のものである、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 3 2】

核酸がポリメラーゼ連鎖反応増幅の産物である、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 3 3】

核酸を第 1 と第 2 種類の共役体と同時に接触させる、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 3 4】

核酸を、第 2 種類のナノ粒子と接触させる前に、第 1 種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドと接触およびハイブリダイズさせる、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 3 5】

第 1 種類のナノ粒子が基板に付けられる、請求項 3 3 4 に記載の方法。

【請求項 3 3 6】

核酸が二本鎖であり、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションによって二本鎖複合体が生じる、請求項 3 1 5 に記載の方法。

【請求項 3 3 7】

少なくとも 2 つの部分をも有する核酸を検出する方法であって、

(a) オリゴヌクレオチドを付着させた基板を核酸と接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは前記核酸配列の第 1 部分に相補的な配列を有し、前記接触が、基板上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(b) 請求項 2 3 7 ~ 2 4 0 のいずれか一項に記載の第 1 種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を、基板に結び付けた前記核酸と接触させるステップであって、共役体のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類は、前記核酸配列の第 2 部分に相補的な配列を有し、前記接触が、共役体のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(c) 検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

10

20

30

40

50

【請求項 3 3 8】

(d) 基板に結び付けた第 1 種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を、請求項 2 3 7 ~ 2 4 0 のいずれか一項に記載の第 2 種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と接触させるステップであって、第 2 種類の共役体のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類は、第 1 種類の共役体のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類の配列に相補的な配列を有するステップと、

(e) 検出可能な変化を観察するステップと、をさらに含む請求項 3 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 3 9】

第 1 種類の共役体のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類が、第 2 種類の共役体のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類の配列に相補的な配列を有し、

(f) 基板に結び付けた第 2 種類の共役体を、第 1 種類の共役体と接触させるステップであって、前記接触が、第 1 および第 2 種類の共役体のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(g) 検出可能な変化を観察するステップと、をさらに含む請求項 3 3 8 に記載の方法。

【請求項 3 4 0】

ステップ (d) か、ステップ (d) および (f) かを、1 または複数回繰り返して、検出可能な変化を観察する、請求項 3 3 9 に記載の方法。

【請求項 3 4 1】

(d) 少なくとも 2 つの部分を含む配列を有するある種類の結合オリゴヌクレオチドを提供するステップであって、該第 1 部分は、第 1 種類の共役体のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類に相補的であるステップと、

(e) 結合オリゴヌクレオチドを基板に結び付けた第 1 種類の共役体と接触させるステップであって、前記接触が、結合オリゴヌクレオチドを第 1 種類の共役体のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(f) 請求項 2 3 7 ~ 2 4 0 のいずれか一項に記載の第 2 種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を提供するステップであって、第 2 種類の共役体のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類が、結合オリゴヌクレオチドの配列の第 2 部分に相補的な配列を有するステップと、

(g) 基板に結び付けた結合オリゴヌクレオチドを第 2 種類の共役体と接触させるステップであって、前記接触が、第 2 種類の共役体のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドを結合オリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(h) 検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項 3 4 2】

(i) 基板に結び付けた第 2 種類の共役体を結合オリゴヌクレオチドと接触させるステップであって、前記接触が、結合オリゴヌクレオチドと第 2 種類の共役体のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(j) 基板に結び付けた結合オリゴヌクレオチドを、第 1 種類の共役体と接触させるステップであって、前記接触が、第 1 種類の共役体のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと結合オリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(k) 検出可能な変化を観察するステップと、をさらに含む請求項 3 4 1 に記載の方法。

【請求項 3 4 3】

ステップ (e) および (g) か、ステップ (e) 、 (g) 、 (i) ならびに (j) かを 1 または複数回繰り返して、検出可能な変化を観察する、請求項 3 4 2 に記載の方法。

【請求項 3 4 4】

基板が透明な基板または不透明な白色基板である、請求項 3 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 4 5】

検出可能な変化は基板上における暗色領域の形成である、請求項 3 4 4 に記載の方法。

【請求項 3 4 6】

共役体のナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項 3 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 4 7】

共役体のナノ粒子が金または銀から形成されている、請求項 3 4 6 に記載の方法。

【請求項 3 4 8】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着されている、請求項 3 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 4 9】

基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成する、請求項 3 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 5 0】

基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成する、請求項 3 4 8 に記載の方法。

【請求項 3 5 1】

検出可能な変化は光学式スキャナで観察される、請求項 3 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 5 2】

前記光学式スキャナが平台型スキャナである、請求項 3 5 1 に記載の方法。

【請求項 3 5 3】

前記スキャナをグレースケール測定値を計算可能なソフトウェアを搭載したコンピュータに連結し、グレースケール測定値を計算して、検出した核酸の定量的測定を提供する、請求項 3 5 1 に記載の方法。

【請求項 3 5 4】

基板に付着したオリゴヌクレオチドが2つの電極間に配置され、共役体のナノ粒子は導電体の材料から形成され、検出可能な変化は導電率の変化である、請求項 3 3 7 に記載の方法。

【請求項 3 5 5】

電極は金から形成され、ナノ粒子は金から形成される、請求項 3 5 4 に記載の方法。

【請求項 3 5 6】

基板を銀染料と接触させて導電率の変化を生じさせる、請求項 3 5 4 に記載の方法。

【請求項 3 5 7】

基板にアレイ状に付着している複数のオリゴヌクレオチドの各々が2つの電極間に配置され、ナノ粒子は導電体の材料から形成され、検出可能な変化は導電率の変化である、請求項 3 4 8 に記載の方法。

【請求項 3 5 8】

電極は金から形成され、ナノ粒子は金から形成される、請求項 3 5 7 に記載の方法。

【請求項 3 5 9】

基板を銀染料と接触させて導電率の変化を生じさせる、請求項 3 5 7 に記載の方法。

【請求項 3 6 0】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、

(a) オリゴヌクレオチドを付着させた基板と核酸を接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、前記接触は、基板上のオリゴヌクレオチドと核酸を有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと

(b) 1または複数の種類の認識オリゴヌクレオチドを付着させた請求項 2 4 3 ~ 2 5 0 のいずれか一項に記載の第1種類のナノ粒子を、基板に結び付けた前記核酸と接触させるステップであって、該1または複数の種類の認識オリゴヌクレオチドの少なくとも1種類は前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、前記接触が、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(c) 検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項 3 6 1】

(d) 認識オリゴヌクレオチドを付着させた請求項 2 4 3 ~ 2 5 0 のいずれか一項に記載の第2種類のナノ粒子を、基板に結び付けた第1種類のナノ粒子と接触させるステップであって、第2種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドの少なくとも1種類が、第1種

10

20

30

40

50

類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも1種類の配列に相補的な配列を有し、前記接触が、第1および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(e) 検出可能な変化を観察するステップと、をさらに含む請求項360に記載の方法。
【請求項362】

第1種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドの少なくとも1種類が、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも1種類の配列に相補的な配列を有し、

(f) 基板に結び付けた第2種類のナノ粒子を第1種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記接触が、第1および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(g) 検出可能な変化を観察するステップと、をさらに含む請求項360に記載の方法。
【請求項363】

ステップ(d)か、ステップ(d)および(f)かを1または複数回繰り返して、検出可能な変化を観察する、請求項362に記載の方法。

【請求項364】

(d) 少なくとも2つの部分を含む配列を有するある種類の結合オリゴヌクレオチドを提供するステップであって、該第1部分は第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも1種類に相補的であるステップと、

(e) 基板に結び付けた第1種類のナノ粒子と結合オリゴヌクレオチドを接触させるステップであって、前記接触が、結合オリゴヌクレオチドを第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(f) 認識オリゴヌクレオチドを付着させた請求項243~250のいずれか一項に記載の第2種類のナノ粒子を提供するステップであって、第2種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドの少なくとも1種類は、結合オリゴヌクレオチドの配列の第2部分に相補的な配列を有するステップと、

(g) 基板に結び付けた結合オリゴヌクレオチドを第2種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記接触が、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを結合オリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(h) 検出可能な変化を観察するステップと、をさらに含む請求項360に記載の方法。
【請求項365】

(i) 基板に結び付けた第2種類のナノ粒子を結合オリゴヌクレオチドと接触させるステップであって、前記接触が、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを結合オリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(j) 基板に結び付けた結合オリゴヌクレオチドを第1種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記接触が、結合オリゴヌクレオチドを第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(k) 検出可能な変化を観察するステップと、をさらに含む請求項364に記載の方法。
【請求項366】

ステップ(e)および(g)か、ステップ(e)、(g)、(i)、ならびに(j)かを1または複数回繰り返して、検出可能な変化を観察する、請求項365に記載の方法。

【請求項367】

基板が透明な基板または不透明な白色基板である、請求項360に記載の方法。

【請求項368】

検出可能な変化は基板上における暗色領域の形成である、請求項367に記載の方法。

【請求項369】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項360に記載の方法。

【請求項370】

ナノ粒子が金または銀から形成されている、請求項369に記載の方法。

【請求項371】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの

10

20

30

40

50

両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着されている、請求項360に記載の方法。

【請求項372】

基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成する、請求項360に記載の方法。

【請求項373】

基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成する、請求項371に記載の方法。

【請求項375】

検出可能な変化は光学式スキャナで観察される、請求項360に記載の方法。

【請求項376】

前記光学式スキャナが平台型スキャナである、請求項375に記載の方法。

【請求項377】

前記スキャナをグレースケール測定値を計算可能なソフトウェアを搭載したコンピュータに連結し、グレースケール測定値を計算して、検出した核酸の定量的測定を提供する、請求項375に記載の方法。

【請求項378】

基板に付着したオリゴヌクレオチドが2つの電極間に配置され、共役体のナノ粒子は導電体の材料から形成され、検出可能な変化は導電率の変化である、請求項360に記載の方法。

【請求項379】

電極は金から形成され、ナノ粒子は金から形成される、請求項378に記載の方法。

【請求項380】

基板を銀染料と接触させて導電率の変化を生じさせる、請求項378に記載の方法。

【請求項381】

基板にアレイ状に付着している複数のオリゴヌクレオチドの各々が2つの電極間に配置され、ナノ粒子は導電体の材料から形成され、検出可能な変化は導電率の変化である、請求項371に記載の方法。

【請求項382】

電極は金から形成され、ナノ粒子は金から形成される、請求項381に記載の方法。

【請求項383】

基板を銀染料と接触させて導電率の変化を生じさせる、請求項381に記載の方法。

【請求項384】

少なくとも2つの部分を有する核酸を検出する方法であって、

(a) オリゴヌクレオチドを付着させた基板と核酸を接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、前記接触が、基板上のオリゴヌクレオチドと核酸を有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと

(b) 1または複数の種類の認識オリゴヌクレオチドを付着させた請求項253～263のいずれか一項に記載の第1種類のナノ粒子を、基板に結び付けた前記核酸と接触させるステップであって、該1または複数の種類の認識オリゴヌクレオチドの少なくとも1種類は前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、前記接触が、ナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(c) 検出可能な変化を観察するステップと、から成る方法。

【請求項385】

(d) 基板に結び付けた第1種類のナノ粒子を、認識オリゴヌクレオチドが付着した請求項253～263のいずれか一項に記載の第2種類のナノ粒子と接触させるステップであって、第2種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドの少なくとも1種類が、第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも1種類の配列に相補的な配列を有し、前記接触が、第1および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(e) 検出可能な変化を観察するステップと、をさらに含む請求項384に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 386】

第1種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドの少なくとも1種類が、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも1種類の配列に相補的な配列を有し、

(f) 基板に結び付けた第2種類のナノ粒子を、第1種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記接触が、第1および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(g) 検出可能な変化を観察するステップと、をさらに含む請求項 385 に記載の方法。

【請求項 387】

ステップ(d)か、ステップ(d)および(f)かを1または複数回繰り返して、検出可能な変化を観察する、請求項 386 に記載の方法。

【請求項 388】

(d) 少なくとも2つの部分を含む配列を有するある種類の結合オリゴヌクレオチドを提供するステップであって、該第1部分は第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも1種類に相補的であるステップと、

(e) 結合オリゴヌクレオチドを、基板に結び付けた第1種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記接触が、結合オリゴヌクレオチドを第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(f) 認識オリゴヌクレオチドが付着した請求項 253 ~ 263 のいずれか一項に記載の第2種類のナノ粒子を提供するステップであって、第2種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドの少なくとも1種類が結合オリゴヌクレオチドの配列の第2部分に相補的な配列を有するステップと、

(g) 基板に結び付けた結合オリゴヌクレオチドを第2種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記接触が、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを結合オリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(h) 検出可能な変化を観察するステップと、をさらに含む請求項 386 に記載の方法。

【請求項 389】

(i) 基板に結び付けた第2種類のナノ粒子を結合オリゴヌクレオチドと接触させるステップであって、前記接触が、結合オリゴヌクレオチドを第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(j) 基板に結び付けた結合オリゴヌクレオチドを第1種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記接触が、第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを結合オリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(k) 検出可能な変化を観察するステップと、をさらに含む請求項 384 に記載の方法。

【請求項 390】

ステップ(e)および(g)か、ステップ(e)、(g)、(i)、ならびに(j)かを1または複数回繰り返して、検出可能な変化を観察する、請求項 389 に記載の方法。

【請求項 391】

基板が透明な基板または不透明な白色基板である、請求項 384 に記載の方法。

【請求項 392】

検出可能な変化は基板上における暗色領域の形成である、請求項 391 に記載の方法。

【請求項 393】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項 384 に記載の方法。

【請求項 394】

ナノ粒子が金または銀から形成されている、請求項 393 に記載の方法。

【請求項 395】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着されている、請求項 384 に記載の方法。

【請求項 396】

基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成する、請求項 384 に記載の方法。

10

20

30

40

50

【請求項 397】

基板を銀染料と接触させて検出可能な変化を生成する、請求項 395 に記載の方法。

【請求項 398】

検出可能な変化は光学式スキャナで観察される、請求項 384 の方法

【請求項 399】

前記光学式スキャナが平台型スキャナである、請求項 398 に記載の方法。

【請求項 400】

前記スキャナをグレースケール測定値を計算可能なソフトウェアを搭載したコンピュータに連結し、グレースケール測定値を計算して、検出した核酸の定量的測定を提供する、請求項 398 に記載の方法。

10

【請求項 401】

基板に付着したオリゴヌクレオチドが 2 つの電極間に配置され、共役体のナノ粒子は導電体の材料から形成され、検出可能な変化は導電率の変化である、請求項 384 に記載の方法は。

【請求項 402】

電極は金から形成され、ナノ粒子は金から形成される、請求項 401 に記載の方法。

【請求項 403】

基板を銀染料と接触させて導電率の変化を生じさせる、請求項 401 に記載の方法。

【請求項 404】

基板にアレイ状に付着している複数のオリゴヌクレオチドの各々が 2 つの電極間に配置され、ナノ粒子は導電体の材料から形成され、検出可能な変化は導電率の変化である、請求項 397 に記載の方法。

20

【請求項 405】

電極は金から形成され、ナノ粒子は金から形成される、請求項 404 に記載の方法。

【請求項 406】

基板を銀染料と接触させて導電率の変化を生じさせる、請求項 404 に記載の方法。

【請求項 407】

少なくとも 2 つの部分有する核酸を検出する方法であって、

(a) オリゴヌクレオチドを付着させた基板と核酸を接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは一对の電極の間に配置されると共に、該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第 1 部分に相補的な配列を有し、前記接触が、基板上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

30

(b) 基板に結び付けた前記核酸を第 1 種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記ナノ粒子は電気を伝導可能な材料から形成されていると共に、前記ナノ粒子には 1 または複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着しており、オリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類は、前記核酸の配列の第 2 部分に相補的な配列を有し、前記接触が、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(c) 導電率の変化を検出するステップと、から成る方法。

【請求項 408】

基板には、1 つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数対の電極が配置されており、前記電極対の各々は、対の間に基板に付着させたある種類のオリゴヌクレオチドを有する、請求項 407 に記載の方法。

40

【請求項 409】

ナノ粒子が金属から形成されている、請求項 407 に記載の方法。

【請求項 410】

ナノ粒子が金または銀から形成されている、請求項 407 に記載の方法。

【請求項 411】

基板を銀染料と接触させて導電率の変化を生じさせる、請求項 407 に記載の方法。

50

【請求項 4 1 2】

(d) 基板に結び付けた第 1 種類のナノ粒子を、第 2 種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記ナノ粒子は電気を伝導可能な材料から形成されていると共に、前記ナノ粒子には 1 または複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着しており、第 2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類は、第 1 種類のナノ粒子上の 1 または複数の種類のオリゴヌクレオチドのうちの 1 種類の配列に相補的な配列を有し、前記接触が、第 1 および第 2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(e) 導電率の変化を検出するステップと、をさらに含む請求項 4 0 7 に記載の方法。

【請求項 4 1 3】

第 1 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類が、第 2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類の配列に相補的な配列を有し、

(f) 基板に結び付けた第 2 種類のナノ粒子を第 1 種類のナノ粒子と接触させるステップであって、前記接触が、第 1 および第 2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(g) 伝導率の変化を検出するステップと、をさらに含む請求項 4 1 2 に記載の方法。

【請求項 4 1 4】

ステップ (d) か、ステップ (d) および (f) かを 1 または複数回繰り返す、導電率の変化を検出する、請求項 4 1 3 に記載の方法。

【請求項 4 1 5】

(d) 基板に結び付けた第 1 種類のナノ粒子を、オリゴヌクレオチドが付着した凝集体ブロープと接触させるステップであって、凝集体ブロープのナノ粒子が電気を伝導可能な材料から形成されており、凝集体上のオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類は、第 1 種類のナノ粒子上の 1 または複数の種類のオリゴヌクレオチドのうちの 1 種類の配列に相補的な配列を有し、前記接触が、凝集体ブロープ上のオリゴヌクレオチドと第 1 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(e) 導電率の変化を検出するステップと、をさらに含む請求項 4 0 7 に記載の方法。

【請求項 4 1 6】

少なくとも 2 つの部分の有する核酸を検出する方法であって、

(a) オリゴヌクレオチドを付着させた基板を核酸と接触させるステップであって、該オリゴヌクレオチドは一对の電極の間に配置されると共に、該オリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第 1 部分に相補的な配列を有し、前記接触が、基板上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(b) 基板に結び付けた前記核酸を、オリゴヌクレオチドを付着させた凝集体ブロープと接触させるステップであって、凝集体ブロープ上のオリゴヌクレオチドの少なくとも 1 種類が、前記核酸の第 2 部分の配列に相補的な配列を有し、凝集体ブロープのナノ粒子は電気を伝導可能な材料から形成されており、前記接触が、凝集体ブロープ上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こるステップと、

(c) 導電率の変化を検出するステップと、から成る方法。

【請求項 4 1 7】

核酸の検出方法であって、基板上で行われ、かつ核酸の存在、量、またはその両方を光学式スキャナで検出するステップから成る方法。

【請求項 4 1 8】

前記光学式スキャナが平台型スキャナである、請求項 4 1 7 に記載の方法。

【請求項 4 1 9】

前記スキャナをグレースケール測定値を計算可能なソフトウェアを搭載したコンピュータに連結し、グレースケール測定値を計算して、検出した核酸の定量的測定を提供する、請求項 4 1 7 に記載の方法。

【請求項 4 2 0】

前記スキャナをグレースケール測定値を計算可能なソフトウェアを搭載したコンピュータ

10

20

30

40

50

に連結し、核酸の存在、核酸の量、またはその両方を定性的に決定する、請求項417に記載の方法。

【請求項421】

請求項237～242のいずれか一項に記載のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体が入った容器を含むキット。

【請求項422】

請求項243～265のいずれか一項に記載のナノ粒子が入った容器を含むキット。

【請求項423】

少なくとも1対の電極が付着された基板を備え、該電極の間に基板に付着させたオリゴヌクレオチドが存在する、キット。

【請求項424】

基板には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはそれらの両方の検出を可能にするようアレイ状に複数対の電極が付着されている、請求項423に記載のキット。

【請求項425】

ナノファブリケーションの方法であって、

選択配列を有する少なくとも1種類の連結オリゴヌクレオチドを提供するステップであって、各種類の連結オリゴヌクレオチドの配列は少なくとも2つの部分を有するステップと

、請求項237～242のいずれか一項に記載の1または複数の種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を提供するステップであって、該1または複数の種類の共役体の各ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドが連結オリゴヌクレオチドの一部分の配列に相補的な配列を有するステップと、

共役体のナノ粒子に付着させたオリゴヌクレオチドを連結オリゴヌクレオチドに有効にハイブリダイズさせ、その結果、共役体のナノ粒子がオリゴヌクレオチドコネクタによって一緒に纏められた所望のナノ材料またはナノ構造が形成される条件下で、連結オリゴヌクレオチドと共役体を接触させるステップと、から成る方法。

【請求項426】

ナノファブリケーションの方法であって、

選択配列を有する少なくとも1種類の連結オリゴヌクレオチドを提供するステップであって、各種類の連結オリゴヌクレオチドの配列は少なくとも2つの部分を有するステップと

、請求項243～265のいずれか一項に記載の1または複数の種類のナノ粒子を提供するステップであって、該1または複数の種類の各々のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドは連結オリゴヌクレオチドの部分の配列に相補的な配列を有するステップと、

ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを連結オリゴヌクレオチドに有効にハイブリダイズさせ、その結果、ナノ粒子がオリゴヌクレオチドコネクタによって一緒に纏められた所望のナノ材料またはナノ構造が形成される条件下で、連結オリゴヌクレオチドとナノ粒子とを接触させるステップと、から成る方法。

【請求項427】

ナノファブリケーションの方法であって、

請求項237～242のいずれか一項に記載の少なくとも2種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を提供するステップであって、

第1種類の共役体のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは、第2種類の共役体のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有し、

第2種類の共役体のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは、第1種類の共役体のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有するステップと、

共役体のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが互いに有効にハイブリダイズして、その結果、所望のナノ材料またはナノ構造が形成される条件下で、第1および第2種類の共役体を接触させるステップと、から成る方法。

10

20

30

40

50

【請求項 4 2 8】

ナノファブリケーションの方法であって、

請求項 2 4 3 ~ 2 6 5 のいずれか一項に記載の少なくとも 2 種類のナノ粒子を提供するステップであって、

第 1 種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドは、第 2 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有し、

第 2 種類のナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドは、第 1 種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有し、

ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが互いに有効にハイブリダイズして、その結果、所望のナノ材料またはナノ構造が形成される条件下で、第 1 および第 2 種類のナノ粒子を接触させるステップと、から成る方法。

10

【請求項 4 2 9】

請求項 2 3 7 ~ 2 4 2 のいずれか一項に記載のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体から構成されたナノ材料またはナノ構造であって、ナノ粒子がオリゴヌクレオチドコネクタによって一緒に纏められているナノ材料またはナノ構造。

【請求項 4 3 0】

請求項 2 4 3 ~ 2 6 5 のいずれか一項に記載のナノ粒子から構成されたナノ材料またはナノ構造であって、ナノ粒子がオリゴヌクレオチドコネクタによって一緒に纏められているナノ材料またはナノ構造。

【請求項 4 3 1】

少なくとも 2 つの部分の有する選択核酸を他の核酸から分離する方法であって、

請求項 2 3 7 ~ 2 4 2 のいずれか一項に記載の 2 つ種類以上のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を提供するステップであって、該 2 種類以上の共役体の各々のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは選択核酸の該少なくとも 2 つの部分のうちの 1 つの配列に相補的な配列を有するステップと、

共役体のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを選択核酸と有効な条件下でハイブリダイズさせ、その結果、選択核酸にハイブリダイズした共役体が凝集して沈降するように、核酸および共役体を接触させるステップと、から成る方法。

20

【請求項 4 3 2】

少なくとも 2 つの部分の有する選択核酸を他の核酸から分離する方法であって、

請求項 2 4 3 ~ 2 6 5 のいずれか一項に記載の 2 種類以上のナノ粒子を提供するステップであって、前記 2 種類以上のナノ粒子の各々の上のオリゴヌクレオチドは、選択核酸の該少なくとも 2 つの部分のうちの 1 つの配列に相補的な配列を有するステップと、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを選択核酸と有効な条件下でハイブリダイズさせ、その結果、選択核酸にハイブリダイズしたナノ粒子が凝集して沈降するように、核酸とナノ粒子を接触させるステップと、から成る方法。

30

【請求項 4 3 3】

オリゴヌクレオチドが付着したナノ粒子である、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体であって、該オリゴヌクレオチドが、ナノ粒子に結合可能な共有結合する環式ジスルフィド官能基を有する、共役体。

40

【請求項 4 3 4】

オリゴヌクレオチドが付着したナノ粒子である、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体であって、該オリゴヌクレオチドが、ナノ粒子に結合可能な共有結合するポリチオール官能基を有する、共役体。

【請求項 4 3 5】

オリゴヌクレオチドが付着したナノ粒子である、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体であって、該オリゴヌクレオチドが、ナノ粒子に結合可能な共有結合するジスルフィド官能基を有し、該オリゴヌクレオチドの少なくとも一部が、核酸または別のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する、共役体。

【請求項 4 3 6】

50

オリゴヌクレオチドが付着したナノ粒子である、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体であって、該オリゴヌクレオチドが、ナノ粒子に結合可能な共有結合するポリチオール官能基を有し、該オリゴヌクレオチドの少なくとも一部が、核酸または別のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する、共役体。

【請求項 4 3 7】

共役体が安定するのに十分な表面密度で前記オリゴヌクレオチドが存在する、請求項 4 3 5 または 4 3 6 に記載の共役体。

【請求項 4 3 8】

オリゴヌクレオチドが少なくとも $10 \text{ ピコモル} / \text{cm}$ の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 4 3 7 に記載の共役体。

【請求項 4 3 9】

オリゴヌクレオチドが少なくとも $15 \text{ ピコモル} / \text{cm}^2$ の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 4 3 8 に記載の共役体。

【請求項 4 4 0】

オリゴヌクレオチドが約 $15 \text{ ピコモル} / \text{cm}^2 \sim$ 約 $40 \text{ ピコモル} / \text{cm}^2$ の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 4 3 9 に記載の共役体。

【請求項 4 4 1】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項 4 3 5 または 4 3 6 に記載の共役体。

【請求項 4 4 2】

ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項 4 4 1 に記載の共役体。

【請求項 4 4 3】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 1 種類の認識オリゴヌクレオチドを含み、該認識部分が、核酸または別のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する、請求項 4 3 5 または 4 3 6 に記載の共役体。

【請求項 4 4 4】

各認識オリゴヌクレオチドがスパーサー部分と認識部分を有し、該スパーサー部分はナノ粒子に結合可能であるように設計されている、請求項 4 4 3 に記載の共役体。

【請求項 4 4 5】

スパーサー部分には、スパーサー部分をナノ粒子に結び付ける環式ジスルフィド官能基を有する部分が、共有結合によって結び付けられる、請求項 4 4 4 に記載の共役体。

【請求項 4 4 6】

スパーサー部分には、スパーサー部分をナノ粒子に結び付けるポリチオール官能基を有する部分が、共有結合によって結び付けられる、請求項 4 4 4 に記載の共役体。

【請求項 4 4 7】

スパーサー部分が少なくとも約 10 ヌクレオチドを含む、請求項 4 4 2 に記載の共役体。

【請求項 4 4 8】

スパーサー部分が約 10 ～ 約 30 のヌクレオチドまで含む、請求項 4 4 7 に記載の共役体。

【請求項 4 4 9】

スパーサーのヌクレオチドの塩基が、すべてアデニン、すべてチミン、すべてシトシン、すべてウラシル、またはすべてグアニンである、請求項 4 4 8 に記載の共役体。

【請求項 4 5 0】

ある種類の希釈剤オリゴヌクレオチドをさらに含む、請求項 4 3 5 または 4 3 6 に記載の共役体。

【請求項 4 5 1】

希釈剤オリゴヌクレオチドが、認識オリゴヌクレオチドのスパーサー部分に含まれるのとほぼ同じ数のヌクレオチドを含んでいる、請求項 4 5 0 に記載のナノ粒子。

【請求項 4 5 2】

希釈剤オリゴヌクレオチドの配列が認識オリゴヌクレオチドのスパーサー部分の配列と同

10

20

30

40

50

じである、請求項 451 に記載のナノ粒子。

【請求項 453】

ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するための、ナノ粒子へのオリゴヌクレオチドの結合方法であって、
ナノ粒子に結合可能な環式スルフィド官能基が共有結合されたオリゴヌクレオチドを提供するステップと、
少なくともオリゴヌクレオチドのうちの一部をナノ粒子と結合させてナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するのに有効な条件下で、オリゴヌクレオチドとナノ粒子を接触させるステップと、から成る方法。

【請求項 454】

ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するための、ナノ粒子へのオリゴヌクレオチドの結合方法であって、
ナノ粒子に結合可能なポリチオール官能基が共有結合されたオリゴヌクレオチドを提供するステップと、
少なくともオリゴヌクレオチドのうちの一部をナノ粒子と結合させてナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するのに有効な条件下で、オリゴヌクレオチドとナノ粒子を接触させるステップと、から成る方法。

【請求項 455】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項 454 または 455 項に記載の方法。

【請求項 456】

ナノ粒子が金ナノ粒子である、請求項 455 に記載の方法。

【請求項 457】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 1 種類の認識オリゴヌクレオチドを含み、各認識オリゴヌクレオチドがスパーサー部分と認識部分を有し、該スパーサー部分には、ナノ粒子に結合可能な官能基を有する部分が共有結合によって結び付けられている、請求項 453 または 454 に記載の方法。

【請求項 458】

スパーサー部分が少なくとも約 10 ヌクレオチドを含む、請求項 457 に記載の方法。

【請求項 459】

スパーサー部分が約 10 ～約 30 のヌクレオチドを含む、請求項 458 に記載の方法。

【請求項 460】

スパーサーのヌクレオチドの塩基が、すべてアデニン、すべてチミン、すべてシトシン、すべてウラシル、またはすべてグアニンである、請求項 459 に記載の方法。

【請求項 461】

オリゴヌクレオチドがある種類の希釈剤オリゴヌクレオチドをさらに含み、前記オリゴヌクレオチドと前記ナノ粒子を、前記オリゴヌクレオチドのうちの各種類のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部がナノ粒子と結合して、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するのに有効な条件下で接触させる、請求項 457 に記載の方法。

【請求項 462】

希釈剤オリゴヌクレオチドが、認識オリゴヌクレオチドのスパーサー部分に含まれるのとはほぼ同じ数のヌクレオチドを含む、請求項 461 に記載の方法。

【請求項 463】

希釈剤オリゴヌクレオチドの配列が認識オリゴヌクレオチドのスパーサー部分の配列と同じである、請求項 462 に記載の方法。

【請求項 464】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 2 種類の認識オリゴヌクレオチドを含む、請求項 457 に記載の方法。

【請求項 465】

ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するための、荷電ナノ粒子へのオリゴヌクレ

10

20

30

40

50

オチドの結合方法であって、
ナノ粒子に結合可能な環式ジスルフィド官能基が共有結合で結び付けられたオリゴヌクレオチドを提供するステップであって、該オリゴヌクレオチドが、
ある種類の認識オリゴヌクレオチドと、
ある種類の希釈剤オリゴヌクレオチドとを含むステップと、
前記オリゴヌクレオチドのうちの各種類のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部がナノ粒子と結合するのに十分な期間、水中でオリゴヌクレオチドとナノ粒子を接触させるステップと、
前記水に少なくとも1つの塩を加えて塩溶液を作製するステップであって、該塩溶液のイオン強度は、ナノ粒子に対するオリゴヌクレオチドの静電引力または静電斥力、ならびに互いに対するオリゴヌクレオチドの静電斥力を少なくとも部分的に克服するのに十分な強度であるステップと、
前記オリゴヌクレオチドのうちの各種類のオリゴヌクレオチドのさらなるオリゴヌクレオチドがナノ粒子に結合して、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するのに十分な追加期間、塩溶液中でオリゴヌクレオチドとナノ粒子を接触させるステップと、から成る方法。

【請求項466】

ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するための、荷電ナノ粒子への結合オリゴヌクレオチドの結合方法であって、
ナノ粒子に結合可能なポリチオール官能基が共有結合で結び付けられたオリゴヌクレオチドを提供するステップであって、該オリゴヌクレオチドが、
ある種類の認識オリゴヌクレオチド、
ある種類の希釈剤オリゴヌクレオチドとを含むステップと、
前記オリゴヌクレオチドのうちの各種類のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部がナノ粒子と結合するのに十分な期間、水中でオリゴヌクレオチドとナノ粒子を接触させるステップと、
前記水に少なくとも1つの塩を加えて塩溶液を作製するステップであって、該塩溶液のイオン強度は、ナノ粒子に対するオリゴヌクレオチドの静電引力または静電斥力、ならびに互いに対するオリゴヌクレオチドの静電斥力を少なくとも部分的に克服するのに十分な強度であるステップと、
前記オリゴヌクレオチドのうちの各種類のオリゴヌクレオチドのさらなるオリゴヌクレオチドがナノ粒子に結合して、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するのに十分な追加期間、塩溶液中でオリゴヌクレオチドとナノ粒子を接触させるステップと、から成る方法。

【請求項467】

ナノ粒子が金属ナノ粒子か半導体ナノ粒子である、請求項465または466に記載の方法。

【請求項468】

ナノ粒子が金ナノ粒子である請求項467に記載の方法。

【請求項469】

すべての塩が1回の追加で水に加えられる、請求項465または466に記載の方法。

【請求項470】

塩が時間の経過と共に徐々に加えられる、請求項465または466に記載の方法。

【請求項471】

前記塩は、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、アンモニア、塩化物、ナトリウム、酢酸塩、酢酸アンモニウム、これらの塩の2以上の組合せ、リン酸緩衝液中のこれらの塩の1つ、および、リン酸緩衝液中のこれらの塩の2以上の組合せから成る群から選択される、請求項465または466に記載の方法。

【請求項472】

前記塩がリン酸緩衝液中の塩化ナトリウムである、請求項471に記載の方法。

【請求項 473】

少なくとも $10 \text{ピコモル} / \text{cm}^2$ の表面密度でナノ粒子表面に存在するオリゴヌクレオチドを有するナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体が生成される、請求項 465 または 466 に記載の方法。

【請求項 474】

オリゴヌクレオチドが少なくとも $15 \text{ピコモル} / \text{cm}^2$ の表面密度でナノ粒子表面に存在する、請求項 473 に記載の方法。

【請求項 475】

オリゴヌクレオチドが約 $15 \text{ピコモル} / \text{cm}^2 \sim$ 約 $40 \text{ピコモル} / \text{cm}^2$ の表面密度でナノ粒子表面に存在する、オリゴヌクレオチドが上に存在する請求項 474 に記載の方法。

10

【請求項 476】

各認識オリゴヌクレオチドがスパーサー部分と認識部分を有し、スパーサー部分にはナノ粒子に結合可能な環式ジスルフィド官能基を有する部分が付着されている、請求項 465 に記載の方法。

【請求項 477】

各認識オリゴヌクレオチドがスパーサー部分と認識部分を有し、スパーサー部分にはナノ粒子に結合可能なポリチオール官能基を有する部分が付着されている、請求項 466 に記載の方法。

【請求項 478】

スパーサー部分が少なくとも約 10ヌクレオチド を含む、請求項 476 または 477 に記載の方法。

20

【請求項 479】

スパーサー部分約 $10 \sim$ 約 30 のヌクレオチドを含む、請求項 478 に記載の方法。

【請求項 480】

スパーサーのヌクレオチドの塩基が、すべてアデニン、すべてチミン、すべてシトシン、すべてウラシル、またはすべてグアニンである、請求項 476 または 477 に記載の方法。

【請求項 481】

希釈剤オリゴヌクレオチドが、認識オリゴヌクレオチドのスパーサー部分に含まれるのとはほぼ同じ数のヌクレオチドを含む、請求項 476 または 477 に記載の方法。

30

【請求項 482】

希釈剤オリゴヌクレオチドの配列が認識オリゴヌクレオチドのスパーサー部分の配列と同じである、請求項 481 に記載の方法。

【請求項 483】

オリゴヌクレオチドが少なくとも 2 種類の認識オリゴヌクレオチドを含む、請求項 476 または 477 に記載の方法。

【請求項 484】

ナノ粒子に結合可能な、共有結合した環式ジスルフィド官能基を有するオリゴヌクレオチド。

40

【請求項 485】

ナノ粒子に結合可能な、共有結合したポリチオール官能基を有するオリゴヌクレオチド。

【請求項 486】

オリゴヌクレオチドと環式ジスルフィド官能基の間に大きな疎水基が位置する、請求項 433、435、445、446、453、465 および 484 に記載の組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

本発明は米国国立衛生研究所 (NIH) 助成番号 GM10265 および陸軍研究所 (ARO) 助成番号 DAA G55-0967-1-0133 の下で政府支援によって完成されたものである。政府は本発明に関し一定の権利を有する。

【0002】

50

本願は、係属中のPCT出願第PCT/US97/12783号(1997年7月21日出願)の一部継続出願であった、係属中の出願番号第09/240,755号(1999年1月29日出願)の一部継続出願であった、係属出願番号第09/344,667号(1999年6月25日出願)の一部継続出願である。上記の文献は引用により本願に組み込まれる。仮出願番号第60/031,809号(1996年7月29日出願)、第60/200,161号(2000年4月26日出願)、第60/176,409号(2000年1月13日出願)の利益も主張する。上記文献の開示は引用により本願に組み込まれる。

【0003】

(発明の分野)

本発明は、天然または合成の、かつ修飾または非修飾の、核酸を検出する方法に関する。また、本発明は、核酸を検出するための材料およびそれらの材料を調製する方法にも関する。本発明はさらに、ナノファブリケーション法に関する。最後に、本発明は、選択核酸を他の核酸から分離する方法に関する。

【0004】

(発明の背景)

核酸を検出し、スクリーニングする方法の開発は、遺伝的、細菌性およびウイルス性疾患の診断に重要である。Mansfield, E. S. 5, Molecular and Cellular Probe, 第9巻, 145-156ページ(1995年)参照。現在、特定の核酸配列の検出に使用されている方法には様々なものがある。同上。しかし、これらの方法は、複雑で、時間がかかり、かつ/または特殊化された高価な装置を必要とする。そのような装置を必要としない簡単で高速の核酸検出法が望ましいことは明らかである。

【0005】

金属および半導体コロイドをナノ材料へと集合させるために様々な方法が開発されている。これらの方法は、対向する両端に対象コロイドに対して化学的親和性を持つ官能基を有する共有結合リンカー分子を使用することに焦点を合わせている。これまでに最も成功した方法の1つ、Brustら, Adv. Mater., 第7巻, 795-797ページ(1995年)は、金コロイドと、十分に確立されたチオール吸着化学の使用を伴っている。Bain & Whitesides, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 第28巻, 506-512ページ(1989年)およびDubois & Nuzzo, Annu. Rev. Phys. Chem., 第43巻, 437-464ページ(1992年)。この方法では、粒子リンカー分子として線状アルカンジチオールを用いる。リンカー分子の各末端のチオール基は、コロイド粒子に共有結合して凝集体構造を形成する。この方法の難点は、プロセスが制御しにくく、集合体が不可逆的に形成されることである。これらの構造の材料特性を十分に利用しようとするならば、集合プロセスを系統的に制御する方法が必要である。

【0006】

医用生体材料の調製およびナノファブリケーション法におけるDNA利用の可能性が認識されている。この研究では、研究者らは、十分に決定された幾何学的形状およびサイズを有する印象的な構造を設計するために、オリゴヌクレオチドの配列特異的分子認識特性を用いることに焦点を当てている。Shekhtmanら, New J. Chem., 第17巻, 757-763ページ(1993年); Shaw & Wang, Science, 第260巻, 533-536ページ(1993年); Chenら, J. Am. Chem. Soc., 第111巻, 6402-6407ページ(1989年); Chen & Seeman, Nature, 第350巻, 631-633ページ(1991年); Smith and Feigon, Nature, 第356巻, 164-168ページ(1992年); Wangら, Biochem., 第32巻, 1899-1904ページ(1993年); Chenら, Biochem., 第33巻, 13540-13546ページ(1994年); Marshら, Nucleic Acids Res., 第23巻, 69

10

20

30

40

50

6-700ページ(1995年);Mirkin, Annu. Review Biophys. Biomol. Struct., 第23巻, 541-576ページ(1994年);Wells, J. Biol. Chem., 第263巻, 1095-1098ページ(1988年);Wangら, Biochem., 第30巻, 5667-5674ページ(1991年)。しかし、DNA構造生成理論を実験的に確認するのはまだまだ先のことである。Seemanら, New J. Chem., 第17巻, 739-755ページ(1993年)。

【0007】

(発明の要約)

本発明は、核酸を検出する方法を提供する。1実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチドを付着させたある種類のナノ粒子(ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体)を核酸と接触させるステップを含む。核酸は少なくとも2つの部分を有し、各ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、該核酸の少なくとも2つの部分の配列に相補的な配列を有している。接触は、核酸とナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸のハイブリダイズによって、検出可能な変化が生じる。

【0008】

別の実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を核酸と接触させるステップを含む。第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有する。第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有する。接触は、核酸とナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こり、このハイブリダイゼーションによって生じた検出可能な変化を観察する。

【0009】

さらなる実施形態では、方法は、第1種類のナノ粒子を付着させた基板を提供するステップを含む。第1種類のナノ粒子にはオリゴヌクレオチドが付着しており、該オリゴヌクレオチドは核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有する。基板を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸を有効にハイブリダイズさせる条件下で核酸と接触させる。その後、オリゴヌクレオチドが付着した第2種類のナノ粒子を提供する。該オリゴヌクレオチドは核酸の配列の1または複数の他の部分に相補的な配列を有する。基板に結び付けられた核酸を、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で、第2種類のナノ粒子オリゴヌクレオチドと接触させる。検出可能な変化はこの時点で観察可能となる。方法は、少なくとも2つの部分を有する選択配列を有する結合オリゴヌクレオチドを提供するステップをさらに含む。該2つの部分の、第1部分は、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的である。結合オリゴヌクレオチドを、結合オリゴヌクレオチドをナノ粒子上のオリゴヌクレオチドに有効にハイブリダイズさせる条件下で、基板に結び付けられた第2種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と接触させる。その後、結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた第3種類のナノ粒子を、結合オリゴヌクレオチドをナノ粒子上のオリゴヌクレオチドに有効にハイブリダイズさせる条件下で、基板に結び付けられた結合オリゴヌクレオチドと接触させる。最後に、そのようなハイブリダイゼーションによって生じた検出可能な変化を観察する。

【0010】

さらに別の実施形態では、方法は、核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた基板と核酸を接触させるステップを含む。接触は、基板上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。その後、基板に結び付けられた核酸を、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた第1種類のナノ粒子と接触させる。接触は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。次に、基板に結び付けられた第1種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を、オリゴヌクレオチドを付着させた第

2種類のナノ粒子と接触させる。第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも1つの部分に相補的な配列を有する。接触は、第1および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。最後に、そのようなハイブリダイゼーションによって生じた検出可能な変化を観察する。

【0011】

別の実施形態では、方法は、核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた基板と核酸を接触させるステップを含む。接触は、基板上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。その後、基板に結び付けられた核酸を、核酸の配列の一部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたりリボソームと接触させる。接触は、リボソーム上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。次に、基板に結び付けられたリボソーム-オリゴヌクレオチド共役体を、少なくとも第1種類のオリゴヌクレオチドを付着させた第1種類のナノ粒子と接触させる。第1種類のオリゴヌクレオチドの、ナノ粒子に付着していない端部には、疎水基が付いている。接触は、疎水的相互作用の結果としてナノ粒子上のオリゴヌクレオチドがリボソームに有効に付着する条件下で起こる。検出可能な変化はこの時点で観察可能となる。方法は、リボソームに結び付けられた第1種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を、オリゴヌクレオチドを付着させた第2種類のナノ粒子と接触させるステップをさらに含む。第1種類のナノ粒子には、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも1つの部分に相補的な配列を有する第2種類のオリゴヌクレオチドが付着する。第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、第1種類のナノ粒子上の第2種類のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する。接触は、第1および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。その後、検出可能な変化を観察する。

【0012】

別の実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチドを付着させた基板と、検出する核酸を接触させるステップを含む。オリゴヌクレオチドは、該核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有する。接触は、基板上のオリゴヌクレオチドを該核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。次に、基板に結び付けられた核酸を、該核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたある種類のナノ粒子と接触させる。接触は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。その後、基板を顕染料と接触させて検出可能な変化を生成し、その検出可能な変化を観察する。

【0013】

さらに別の実施形態では、方法は、第1種類のナノ粒子を付着させた基板を提供するステップを含む。ナノ粒子には、検出する核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。その後、核酸を、該核酸とナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で、基板に付けられたナノ粒子と接触させる。次に、オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体ブロープを提供する。凝集体ブロープのナノ粒子は、該ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。凝集体ブロープの前記少なくとも2種類のナノ粒子のうちの少なくとも1種類には、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。最後に、基板に結び付けられた核酸を、該核酸と凝集体ブロープ上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で、凝集体ブロープと接触させ、検出可能な変化を観察する。

【0014】

さらなる実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチドを付着させた基板を提供するステップを含む。オリゴヌクレオチドは、検出する核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有する。オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体ブロープを提供する。凝集体ブロープのナノ粒子は、該ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの

一部がハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。凝集体ブロープの前記少なくとも2種類ナノ粒子のうちの少なくとも1種類には、前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有するそれにオリゴヌクレオチドが付着している。核酸、基板および凝集体ブロープを、凝集体ブロープ上のオリゴヌクレオチドおよび基板上のオリゴヌクレオチドと核酸とを有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させ、検出可能な変化を観察する。

【0015】

さらなる実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチドを付着させた基板を提供するステップを含む。オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体ブロープを提供する。凝集体ブロープのナノ粒子は、該ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。凝集体ブロープの前記少なくとも2種類ナノ粒子の少なくとも1種類には、検出する核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。少なくとも2種類のオリゴヌクレオチドを付着させたある種類のナノ粒子を提供する。第1種類のオリゴヌクレオチドは前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、第2種類のオリゴヌクレオチドは、基板に付着したオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する。核酸、凝集体ブロープ、ナノ粒子および基板を、凝集体ブロープ上およびナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸を有効にハイブリダイズさせ、かつナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを基板上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させ、検出可能な変化を観察する。

【0016】

別の実施形態では、方法は、検出する核酸を、オリゴヌクレオチドを付着させた基板と接触させるステップを含む。オリゴヌクレオチドは、前記核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有する。接触は、基板上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。基板に結び付けられた核酸を、前記核酸の配列の一部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたりボソームと接触させる。接触は、リボソーム上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体ブロープを提供する。凝集体ブロープのナノ粒子は、該ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。凝集体ブロープの前記少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、ナノ粒子に付着しない端部に疎水基が付いたオリゴヌクレオチドが付着する。基板に結び付けられたリボソームを、疎水的相互作用の結果として凝集体ブロープ上のオリゴヌクレオチドがリボソームに付着するのに有効な条件下で、凝集体ブロープと接触させ、検出可能な変化を観察する。

【0017】

さらに別の実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチドを付着させた基板を提供するステップを含む。該オリゴヌクレオチドは、検出する核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有する。少なくとも2種類のナノ粒子を含むコアブロープを提供する。各種類のナノ粒子には、他の種類のナノ粒子の少なくとも1つの上のオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドが付着している。凝集体ブロープのナノ粒子は、該ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドがハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。次に、2種類のオリゴヌクレオチドを付着したある種類のナノ粒子を提供する。第1種類のオリゴヌクレオチドは、該核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有する。第2種類のオリゴヌクレオチドは、コアブロープの前記少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類に付着したオリゴヌクレオチドの配列の一部分に相補的な配列を有する。核酸、ナノ粒子、基板およびコアブロープを、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドおよび基板上のオリゴヌクレオチドと該核酸を有効にハイブリダイズさせ、かつコアブロープ上のオリゴヌクレオチドをナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させ、検出可能な変化を観察する。

【0018】

方法の別の実施形態は、検出する核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するオリゴヌ

クレオチドを付着させた基板を提供するステップを含む。少なくとも2種類のナノ粒子を含むコアプロープを提供する。各種類のナノ粒子には、少なくとも1つの他の種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドに相補的なオリゴヌクレオチドが付着している。凝集体プロープのナノ粒子は、該ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドがハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。前記核酸の配列の第2部分に相補的な配列と、コアプロープの前記少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類に付着したオリゴヌクレオチドの配列の一部分に相補的な配列とを含む、ある種類の連結オリゴヌクレオチドを提供する。核酸、連結オリゴヌクレオチド、基板およびコアプロープを、連結オリゴヌクレオチドおよび基板上のオリゴヌクレオチドを前記核酸と有効にハイブリダイズさせ、かつコアプロープ上のオリゴヌクレオチドを連結オリゴヌクレオチド上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させ、検出可能な変化を観察する。

10

【0019】

さらに別の実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を提供するステップと、1または複数の種類の結合オリゴヌクレオチドを提供するステップを含む。各結合オリゴヌクレオチドは2つの部分を有しており、1つの部分の配列は、核酸の複数の部分の1つの配列に相補的である。また、もう1つの部分の配列は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的である。ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と結合オリゴヌクレオチドを、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを結合オリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させる。核酸と結合オリゴヌクレオチドを、結合オリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させる。その後、検出可能な変化を観察する。ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を、核酸との接触に先立って、結合オリゴヌクレオチドと接触させてもよいし、または3つすべてを同時に接触させてもよい。

20

【0020】

別の実施形態では、方法は、核酸をオリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類の粒子と接触させるステップを含む。第1種類の粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、該粒子に付けられない端部にエネルギー供与体分子を有する。第2種類の粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、該粒子に付けられない端部にエネルギー受容体分子を有する。接触は、粒子上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。また、そのようなハイブリダイゼーションによって生じた検出可能な変化を観察する。エネルギー供与体および受容体分子は蛍光分子であってよい。

30

【0021】

さらなる実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチドを付着させたある種類のマイクロスフェアを提供するステップを含む。オリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、蛍光分子で標識される。核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた、検出可能な変化を生成するある種類のナノ粒子を提供する。核酸を、ラテックスマイクロスフェアおよびナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせる条件下でマイクロスフェアおよびナノ粒子と接触させ、その後、蛍光の変化、別の検出可能な変化またはその両方を観察する。

40

【0022】

別の実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチドを付着させた第1種類の金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子を提供するステップを含む。オリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、蛍光分子で標識される。オリゴヌクレオチドを付着させた第2種類の金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子も提供する。該オリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、蛍光分子と同様に標識される。核酸を、核酸と該2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で、2種類のナノ粒子と接触させ、その後、蛍光の変化を観察する。

【0023】

さらなる実施形態では、方法は、オリゴヌクレオチドを付着させたある種類の粒子を提供

50

するステップを含む。該オリゴヌクレオチドは第1部分と第2部分を有し、両部分は、核酸の配列の一部に相補的である。第1部分と第2部分を含むある種類のプローブオリゴヌクレオチドも提供する。該第1部分は、粒子に付着させたオリゴヌクレオチドの該第1部分に相補的な配列を有し、また、両部分は核酸の配列の一部に相補的である。またプローブオリゴヌクレオチドは、その一端を、リポーター分子で標識される。その後、粒子およびプローブオリゴヌクレオチドを、粒子上のオリゴヌクレオチドをプローブオリゴヌクレオチドと有効にハイブリダイズさせてサテライトプローブを生成する条件下で接触させる。その後、サテライトプローブを、プローブオリゴヌクレオチドと核酸を有効にハイブリダイズさせる条件下で核酸と接触させる。粒子は除去し、リポーター分子を検出する。

10

【0024】

本発明の方法のさらに別の実施形態では、核酸を、オリゴヌクレオチドを付着させた基板と核酸を接触させることにより検出する。該オリゴヌクレオチドは核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有する。該オリゴヌクレオチドは、基板に置かれた一対の電極の間に配置される。接触は、基板上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。その後、基板に結び付けられた核酸がある種類のナノ粒子と接触させる。ナノ粒子は、電気を伝導可能な材料で形成されている。ナノ粒子には1または複数の種類のオリゴヌクレオチドが付着しており、該1または複数の種類のオリゴヌクレオチドの少なくとも1つは、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有する。接触は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを核酸と有効にハイブリダイズさせる条件下で起こる。核酸が存在する場合、導電率の変化を検出することが可能である。好ましい実施形態では、基板上には、1つの核酸中の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出、またはその両方の検出を可能にするようアレイ状に複数対の電極が配置されている。アレイ中の各電極対は、2つの電極間に、基板に付着されたある種類のオリゴヌクレオチドを有するだろう。

20

【0025】

本発明は、方法が基板上で行われる、核酸の検出方法をさらに提供する。該方法は、光学式スキャナで核酸の存在、量またはその両方を検出するステップを含む。

【0026】

本発明は、核酸を検出するためのキットをさらに提供する。1実施形態では、キットは、オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を入れた少なくとも1つの容器を含む。第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有する。第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有する。

30

【0027】

代わりに、キットは少なくとも2つの容器を含んでもよい。第1容器には、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着されたナノ粒子が入る。第2容器には、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子が入る。

【0028】

さらなる実施形態では、キットは少なくとも1つの容器を含む。該容器には、オリゴヌクレオチドを付着させた金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子が入っている。オリゴヌクレオチドは核酸の一部に相補的な配列を有し、ナノ粒子に付着されないオリゴヌクレオチドの端部には蛍光分子が付いている。

40

【0029】

さらに別の実施形態では、キットは基板を含む。基板にはナノ粒子が付着し、該ナノ粒子には、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。キットはさらに、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を入れた、第1容器も含む。キットは、少なくとも2つの部分を有する選択配列を有する結合オリゴヌクレオチドを入れた第2容器もさらに含む。2つの部分のうちの第1部分は、第1容器中のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも

50

1つの部分に相補的である。キットはさらに、結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を入れた第3容器も含む。

【0030】

別の実施形態では、キットは、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた基板と、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着したナノ粒子を入れた第1容器と、第1容器中のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの少なくとも一部に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着したナノ粒子を入れた第2容器とを含む。

【0031】

さらに別の実施形態では、キットは、基板と、ナノ粒子を入れた第1容器と、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有する第1種類のオリゴヌクレオチドを入れた第2容器と、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有する第2種類のオリゴヌクレオチドを入れた第3容器と、第2種類のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部と相補的な配列を有する第3の種類のオリゴヌクレオチドを入れた第4容器とを含む。

【0032】

さらなる実施形態では、キットは、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させた基板を含む。キットはまた、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着させたりボソームを入れた第1容器と、少なくとも第1種類のオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を入れた第2容器とを有する。第1種類のオリゴヌクレオチドは、疎水的相互作用によりナノ粒子をリボソームに付着できるように、そのナノ粒子に付着されない端部に疎水基を有する。キットは、第1種類のナノ粒子に付着された第2種類のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも1つの部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着された第2種類のナノ粒子を入れた第3容器をさらに含む。第1種類のナノ粒子に付着された第2種類のオリゴヌクレオチドは、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する。

【0033】

別の実施形態では、キットは、ナノ粒子を付着させた基板を含む。ナノ粒子には、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。キットはまた、凝集体プローブを入れた第1容器も含む。凝集体プローブは、オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含む。凝集体プローブのナノ粒子は、その各々に付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。凝集体プローブの前記少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。

【0034】

さらに別の実施形態では、キットは、オリゴヌクレオチドを付着させた基板を含む。オリゴヌクレオチドは核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有する。キットはさらに、凝集体プローブを入れた第1容器を含む。凝集体プローブは、オリゴヌクレオチドが付着した少なくとも2種類のナノ粒子を含む。凝集体プローブのナノ粒子は、その各々に付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。凝集体プローブの前記少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。

【0035】

さらなる実施形態では、キットは、オリゴヌクレオチドを付着させた基板と、凝集体プローブを入れた第1容器とを含む。凝集体プローブは、オリゴヌクレオチドが付着した少なくとも2種類のナノ粒子を含む。凝集体プローブのナノ粒子は、その各々に付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。凝集体プローブの前記少なくとも1種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。キットはまた、ナノ粒子を入れた第2容器も含む。該ナノ粒子には、少なくとも2種類のオリゴヌクレオチドが付着し

10

20

30

40

50

ている。第1種類のオリゴヌクレオチドは核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有する。第2種類のオリゴヌクレオチドは基板に付着したオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する。

【0036】

別の実施形態では、キットは、オリゴヌクレオチドが付着した基板を含む。オリゴヌクレオチドは核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有する。キットはまた、オリゴヌクレオチドが付着したリボソームを入れた第1容器も含む。オリゴヌクレオチドは核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有する。キットはさらに、オリゴヌクレオチドが付着した少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体ブロープを入れた、第2容器も含む。凝集体ブロープのナノ粒子は、その各々に付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。凝集体ブロープの前記少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、ナノ粒子に付着しない端部に疎水基を有するオリゴヌクレオチドが付着している。

【0037】

さらなる実施形態では、キットは、オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を入れた第1容器を含み得る。キットはまた、1または複数の追加の容器も含み、各容器には結合オリゴヌクレオチドを入れる。各結合オリゴヌクレオチドは、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する第1部分と、検出する核酸の一部分の配列に相補的な配列を有する第2部分とを有する。各配列が検出する核酸の配列の一部分に相補的である限り、結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列は異なってもよい。別の実施形態では、キットは、オリゴヌクレオチドを付着させた1種類のナノ粒子と、1または複数の種類の結合オリゴヌクレオチドを入れた容器を含む。該1または複数の種類の結合オリゴヌクレオチドの各々は、少なくとも2つの部分を含む配列を有している。第1部分は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的であり、そのため、容器内で結合オリゴヌクレオチドはナノ粒子上のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされる。第2部分は、核酸の一部分の配列に相補的である。

【0038】

別の実施形態では、キットは、2種類の粒子を入れた1または2つの容器を含み得る。第1種類の粒子には、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを付着している。オリゴヌクレオチドは、その粒子に付着しない端部が、エネルギー供与体で標識される。第2種類の粒子には、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。オリゴヌクレオチドは、その粒子に付着しない端部が、エネルギー受容体で標識される。エネルギー供与体と受容体は蛍光分子であってよい。

【0039】

さらなる実施形態では、キットは、オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を入れた第1容器を含む。キットはまた、各容器に結合オリゴヌクレオチドを入れた、1または複数の追加の容器も含む。各結合オリゴヌクレオチドは、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部分に相補的な配列を有する第1部分と、検出する核酸の部分の配列に相補的な配列を有する第2部分とを有する。各配列が検出する核酸の部分に相補的である限り、結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列は異なってもよい。さらに別の実施形態では、キットは、オリゴヌクレオチドを付着させた1種類のナノ粒子と、1または複数の種類の結合オリゴヌクレオチドを入れた容器を含む。該1または複数の種類の結合オリゴヌクレオチドの各々は、少なくとも2つの部分を含む配列を有する。その第1部分は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的であり、そのため、容器内で結合オリゴヌクレオチドはナノ粒子上のオリゴヌクレオチドにハイブリダイズされる。第2部分は、核酸の一部分の配列に相補的である。

【0040】

別の代替実施形態では、キットは少なくとも3つの容器を含む。第1容器にはナノ粒子が入っている。第2容器は、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有する第1のオリゴヌクレオチドが入っている。第3容器には、核酸の第2部分の配列に相補的な配列を有する

第2のオリゴヌクレオチドが入っている。キットはさらに、少なくとも2つの部分(第1部分は第2のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも1つの部分に相補的)を有する選択配列を有する結合オリゴヌクレオチドを入れた第4容器と、結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドを入れた第5の容器も含む。

【0041】

別の実施形態では、キットは2種類の粒子を入れた1または2つの容器を含む。第1種類の粒子には、核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、かつナノ粒子に付着しない端部にエネルギー供与体分子が付いた、オリゴヌクレオチドが付着している。第2種類の粒子には、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、かつナノ粒子に付着しない端部にエネルギー受容体分子が付いた、オリゴヌクレオチドが付着している。エネルギー供与体と受容体は蛍光分子であってよい。

【0042】

さらなる実施形態では、キットは、オリゴヌクレオチドを付着させたある種類のマイクロスフェアを入れた第1容器を含む。該オリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、蛍光分子で標識される。オリゴヌクレオチドを付着させたある種類のナノ粒子を入れた第2容器を含む。該オリゴヌクレオチドは、キットは、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有する。

【0043】

別の実施形態では、キットは、オリゴヌクレオチドを付着させた第1種類の金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子を入れた第1容器を含む。該オリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有し、蛍光分子で標識される。キットはまた、オリゴヌクレオチドを付着させた第2種類の金属ナノ粒子または半導体ナノ粒子を入れた第2容器を含む。該オリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第2部分に相補的な配列を有し、蛍光分子で標識される。

【0044】

別の実施形態では、キットは、凝集体プローブを入れた容器を含む。凝集体プローブは、オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含む。凝集体プローブのナノ粒子は、その各々に付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。凝集体プローブの前記少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、核酸の配列の一部分に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。

【0045】

さらなる実施形態では、キットは、凝集体プローブを入れた容器を含む。凝集体プローブは、オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含む。凝集体プローブのナノ粒子は、その各々に付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。凝集体プローブの前記少なくとも2種類のナノ粒子の少なくとも1種類には、ナノ粒子に付着しない端部に疎水基が付いた、オリゴヌクレオチドが付着している。

【0046】

さらなる実施形態では、キットは、サテライトプローブを入れた容器を含む。サテライトプローブは、オリゴヌクレオチドが付着した粒子を含む。オリゴヌクレオチドは第1部分と第2部分を有し、両部分は核酸の配列の部分に相補的な配列を有する。サテライトプローブは、ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドとハイブリダイズするプローブオリゴヌクレオチドも含む。プローブオリゴヌクレオチドは第1部分と第2部分を有する。該第1部分は、粒子に付着したオリゴヌクレオチドの第1部分の配列に相補的な配列を有する。また、両部分は、核酸の配列の部分に相補的な配列を有する。プローブオリゴヌクレオチドはさらに、その一端にリポーター分子を有する。

【0047】

別の実施形態では、キットはコアプローブを入れた容器を含む。コアプローブは、オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含む。コアプローブのナノ粒子

10

20

30

40

50

は、該ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果、互いに結び付けられる。

【0048】

さらに別の実施形態では、キットは、少なくとも1対の電極が付着された基板であって、該電極間で基板に対してオリゴヌクレオチドが付着された基板を含む。オリゴヌクレオチドは、検出する核酸の配列の第1部分に相補的な配列を有する。

【0049】

本発明はさらに、サテライトプローブ、凝集体プローブおよびコアプローブを提供する。本発明はさらに、ナノ粒子を付着させた基板を提供する。該ナノ粒子には、核酸の第1部分の配列に相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着され得る。

【0050】

本発明はさらに、オリゴヌクレオチドを付着させた金属または半導体ナノ粒子を提供する。オリゴヌクレオチドはナノ粒子に付着しない端部が蛍光分子で標識される。

【0051】

本発明はさらに、ナノファブリケーションの方法を提供する。方法は、選択配列を有する少なくとも1種類の連結オリゴヌクレオチドを提供するステップであって、各種類の連結オリゴヌクレオチドの配列が少なくとも2つの部分を有するステップを含む。方法は、オリゴヌクレオチドを付着させた1または複数の種類のナノ粒子を提供するステップであって、各種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが連結オリゴヌクレオチドの配列の部分に相補的な配列を有するステップをさらに含む。連結オリゴヌクレオチドとナノ粒子を、所望のナノ材料かナノ構造が形成されるように、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを連結オリゴヌクレオチドに有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させる。

【0052】

本発明は、ナノファブリケーションの別の方法を提供する。方法は、オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を提供するステップを含む。第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する。第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、第1種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体上のオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する。第1および第2種類のナノ粒子を、所望のナノ材料かナノ構造が形成されるように、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを互いに有効にハイブリダイズさせる条件下で接触させる。

【0053】

本発明はさらに、オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子から構成されたナノ材料またはナノ構造であって、該ナノ粒子がオリゴヌクレオチドコネクタによって一緒に纏められたナノ材料またはナノ構造を提供する。

【0054】

本発明はさらに、オリゴヌクレオチドを付着させた少なくとも2種類のナノ粒子を含む組成物を提供する。第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の第1部分が連結オリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する。第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分が連結オリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する。

【0055】

本発明はさらに、オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を入れた第1容器とオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を入れた第2容器を含む容器のアセンブリを提供する。第1容器中のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは、第2容器中のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する。第2容器中のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは、第1容器中のナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドの配列に相補的な配列を有する。

【0056】

本発明はさらに、複数の異なるオリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を提供する。本発明は、少なくとも2つの部分を有する選択核酸を他の核酸から分離する方法をさらに提供する。方法は、オリゴヌクレオチドを付着させた1または複数の種類のナノ粒子を提

供するステップであって、該1または複数のナノ粒子の各々の上のオリゴヌクレオチドは選択核酸の前記少なくとも2つの部分のうちの1つの配列に相補的な配列を有するステップを含む。選択核酸および他の核酸を、選択核酸とハイブリダイズしたナノ粒子が濃集して沈降するように、選択核酸とナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを有効にハイブリダイズさせる条件下で、ナノ粒子と接触させる。

【0057】

さらに、本発明は、ユニークなナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を作製する方法を提供する。第1のそのような方法は、安定したナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するために荷電ナノ粒子ヘオリゴヌクレオチドを結合させるステップを含む。そうするために、ナノ粒子に結合可能な官能基を有する部分が共有結合で結び付いているオリゴヌクレオチドを、少なくともオリゴヌクレオチドの一部が該官能基によってナノ粒子に結び付けられるのに十分な時間、ナノ粒子と水中で接触させる。次に、少なくとも1つの塩を水に加えて、塩溶液を作製する。塩溶液のイオン強度は、オリゴヌクレオチドの互いに対する静電斥力と、正に帯電したナノ粒子に対する負に帯電したオリゴヌクレオチドの静電引力か、負に帯電したナノ粒子に対する正に帯電したオリゴヌクレオチドの静電引力かの一方とを少なくとも部分的に克服するのに十分な強度でなければならない。塩を加えた後、オリゴヌクレオチドとナノ粒子を、追加オリゴヌクレオチドがナノ粒子に結合して安定したナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するのに十分な追加期間、塩溶液中でインキュベートされる。本発明はさらに、安定したナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体、核酸を検出かつ分離するための該共役体の使用方法、該共役体を含むキット、該共役体を使用したナノファブ리케이션の方法、ならびに、該共役体を含むナノ材料およびナノ構造を包含する。

【0058】

本発明は、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するためにオリゴヌクレオチドをナノ粒子に結合させる別の方法を提供する。方法は、ある種類の認識オリゴヌクレオチドとある種類の希釈剤オリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを提供するステップを含む。オリゴヌクレオチドとナノ粒子を、該ある種類のオリゴヌクレオチドの各々の少なくとも一部がナノ粒子と結合して共役体を生成するのに有効な条件下で接触させる。本発明はさらに、該方法によって生成されたナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体、核酸を検出かつ分離するために該共役体を使用する方法、該共役体を含むキット、該共役体を使用したナノファブ리케이션の方法、ならびに、該共役体を含むナノ材料およびナノ構造を包含する。「認識オリゴヌクレオチド」とは、核酸またはオリゴヌクレオチド標的の配列の少なくとも一部分に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドである。「希釈剤オリゴヌクレオチド」は、認識オリゴヌクレオチドがナノ粒子に結び付けられる能力または、認識オリゴヌクレオチドがその標的に結び付く能力に干渉しない任意の配列を有し得る。

【0059】

本発明はさらに、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するためにオリゴヌクレオチドをナノ粒子に結合させる別の方法を提供する。方法は、少なくとも1種類の認識オリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドを提供するステップを含む。認識オリゴヌクレオチドは認識部分とスパーサー部分を含む。認識オリゴヌクレオチドの認識部分は、核酸またはオリゴヌクレオチド標的の配列の少なくとも1部分に相補的な配列を有する。認識オリゴヌクレオチドのスパーサー部分は、スパーサー部分がナノ粒子に結合可能であるように設計される。ナノ粒子に認識オリゴヌクレオチドのスパーサー部分が結合した結果、認識部分はナノ粒子の表面から離れ、その標的とのハイブリダイズのためによりアクセス可能とある。共役体を生成するために、少なくとも認識オリゴヌクレオチドの一部がナノ粒子に結合するのに有効な条件下で、認識オリゴヌクレオチドを含むオリゴヌクレオチドとナノ粒子を接触させる。本発明はさらに、この方法によって生成されたナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体、核酸を検出かつ分離するために該共役体を使用する方法、該共役体を含むキット、該共役体を使用したナノファブ리케이션の方法、ならびに、該共役体を含むナノ材料およびナノ構造を包含する。

【0060】

本発明は、環式ジスルフィドを含むリンカーによって、ナノ粒子にオリゴヌクレオチドを付着させる方法を含む。適切な環式ジスルフィドは、その環内に2つの硫黄原子を含めた5つまたは6つの原子を有する。適切な環式ジスルフィドは市販されている。環式のジスルフィドの還元形も使用することが可能である。好ましくは、リンカーは、環式ジスルフィドに付着された炭化水素部分をさらに含む。適切な炭化水素は市販されており、(例えば付表に記述されるように)環式ジスルフィドに取り付けられる。好ましくは、炭化水素部分はステロイド残基である。リンカーがオリゴヌクレオチドに付けられ、オリゴヌクレオチドリンカーが本明細書に記載したようにナノ粒子に付着される。

【0061】

本明細書に使用する場合、ある「種類のオリゴヌクレオチド」とは、同じ配列を有する複数のオリゴヌクレオチド分子を表す。オリゴヌクレオチドが付着している、ある「種類の」ナノ粒子、共役体、粒子、ラテックスミクロスフェアなどは、同種類のオリゴヌクレオチドが付着している複数の上記物質を指す。また、「オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子」は、「ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体」、または、本発明の検出法の場合には、「ナノ粒子-オリゴヌクレオチドプローブ」、「ナノ粒子プローブ」もしくは単に「プローブ」と称されることもある。

【0062】

(好ましい実施形態の詳細な説明)

本発明の実施に有用なナノ粒子としては、金属(例えば、金、銀、銅および白金)、半導体(例えば、CdSe、CdS、およびCdSまたはZnSでコートしたCdSe)ならびに磁性(例えば、強磁性)コロイド材料が挙げられる。本発明の実施に有用な他のナノ粒子には、ZnS、ZnO、TiO₂、AgI、AgBr、HgI₂、PbS、PbSe、ZnTe、CdTe、In₂S₃、In₂Se₃、Cd₃P₂、Cd₃As₂、InAs、およびGaAsが含まれる。ナノ粒子のサイズは、好ましくは約5〜約150nm(平均直径)、より好ましくは約5〜約50nm、最も好ましくは約10〜約30nmである。ナノ粒子はロッドであってもよい。

【0063】

金属、半導体および磁性ナノ粒子の調製法は当該技術分野において周知である。例えば、Schmid, G. (編), *Clusters and Colloids* (VCH, Weinheim, 1994年); Hayat, M. A. (編), *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications* (Academic Press, San Diego, 1991年); Massart, R., *IEEE Transactions On Magnetism*, 第17巻, 1247ページ(1981年); Ahmadi, T. S. 5, *Science*, 第272巻, 1924ページ(1996年); Henglein, A. 5, *J. Phys. Chem.*, 第99巻, 14129ページ(1995年); Curtis, A. C. 5, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 第27巻, 1530ページ(1988年)参照。

【0064】

ZnS、ZnO、TiO₂、AgI、AgBr、HgI₂、PbS、PbSe、ZnTe、CdTe、In₂S₃、In₂Se₃、Cd₃P₂、Cd₃As₂、InAs、およびGaAsナノ粒子の調製法も当該技術分野において公知である。例えば、Weller, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 第32巻, 41ページ(1993年); Henglein, *Top. Curr. Chem.*, 第143巻, 113ページ(1988年); Henglein, *Chem. Rev.*, 第89巻, 1861ページ(1989年); Brus, *Appl. Phys. A.*, 第53巻, 465ページ(1991年); Bahncmann, *Photochemical Conversion and Storage of Solar Energy* (PelizzettiおよびSchiveloni編, 1991年), 251ページ; WangおよびHerron, *J. Ph*

10

20

30

40

50

ys. Chem., 第95巻, 525ページ(1991年); Olshavskyら, J. Am. Chem. Soc., 第112巻, 9438ページ(1990年); Ushidaら, J. Phys. Chem., 第95巻, 5382ページ(1992年)参照。

【0065】

適当なナノ粒子は、例えば、テッド・ペラ社(Ted Pella, Inc.)(金)、アマーシャム社(Amersham Corporation)(金)およびナノプローブ社(Nanoprobe, Inc.)(金)からも市販されている。

【0066】

核酸の検出に用いるのに好ましいのは金ナノ粒子である。金コロイド粒子は、美しい色を発するバンドに対して高い吸光係数を有する。これらの印象的な色は、粒度、濃度、粒子間間隔や、凝集体の凝集度および形状(幾何学)に応じて変化し、それが、これらの材料を比色アッセイ用に特に魅力的なものとしている。例えば、金ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドとオリゴヌクレオチドおよび核酸とがハイブリダイズすると直ぐに、肉眼にも見える変色が生じる(例えば、実施例参照)。

【0067】

金ナノ粒子は、上記に挙げたのと同じ理由で、また、それらの安定性、電子顕微鏡検査による画像化の容易さや、十分に特性決定されたチオール官能基による修飾(以下参照)などの理由から、ナノファブ리케이션に用いるのにも特に好ましい。また、半導体ナノ粒子も、それらの固有の電子特性および発光特性のゆえにナノファブ리케이션用に好ましい。

【0068】

オリゴヌクレオチドをナノ粒子に付着させるために、ナノ粒子もしくはオリゴヌクレオチドまたは両者を官能化する。そのような方法は当該技術分野では公知である。例えば、3'末端または5'末端がアルカンチオールにより官能化されたオリゴヌクレオチドは、金ナノ粒子に容易に付着する。Whitesides, Proceedings of the Robert A. Welch Foundation 39th Conference On Chemical Research Nanophase Chemistry, Houston, TX, 109-121ページ(1995年)参照。さらに、Mucicら, Chem. Commun., 555-557ページ(1996年)(平らな金表面に3'チオールDNAを付着させる方法を記載している;この方法は、オリゴヌクレオチドをナノ粒子に付着させるのに用い得る)参照。アルカンチオール法は、オリゴヌクレオチドを、他の金属、半導体および磁性コロイドや、上記にリストした他のナノ粒子に付着させるのにも用い得る。オリゴヌクレオチドを固体表面に付着させるための他の官能基には、ホスホロチオエート基(例えば、オリゴヌクレオチド-ホスホロチオエートを金表面に結合させることに關しては、米国特許第5,472,881号参照)、置換アルキルシロキサン(例えば、シリカおよびガラス表面へのオリゴヌクレオチドの結合に關しては、Burwell, Chemical Technology, 第4巻, 370-377ページ(1974年)ならびにMatteucciおよびCaruthers, J. Am. Chem. Soc., 第103巻, 3185-3191ページ(1981年)、アミノアルキルシロキサンおよび類似のメルカプトアルキルシロキサンの結合に關しては、Grabarら, Anal. Chem., 第67巻, 735-745ページ参照)が含まれる。オリゴヌクレオチドを固体表面に付着させるには、5'チオヌクレオチドまたは3'チオヌクレオチドを末端基とするオリゴヌクレオチドを用いてもよい。以下の参考文献はオリゴヌクレオチドをナノ粒子に付着させるのに用い得る他の方法を記載している:Nuzzoら, J. Am. Chem. Soc., 第109巻, 2358ページ(1987年)(金上のジスルフィド);AllaraおよびNuzzo, Langmuir, 第1巻, 45ページ(1985年)(アルミニウム上のカルボン酸);AllaraおよびTompkins, J. Colloid Interface Sci., 第49巻, 410-421ページ(1974年)(銅上のカルボン酸);Iler, The Chemistry Of Silica, 第6章, (Wiley, 1979年)(シリカ上のカル

10

20

30

40

50

ボン酸) ; Timmons and Zisman, J. Phys. Chem., 第69巻, 984-990ページ(1965年)(白金上のカルボン酸) ; SoriagaおよびHubbard, J. Am. Chem. Soc., 第104巻, 3937ページ(1982年)(白金上の芳香環化合物) ; Hubbard, Acc. Chem. Res., 第13巻, 177ページ(1980年)(白金上のスルホラン、スルホキシドおよび他の官能化溶剤) ; Hickmanら, J. Am. Chem. Soc., 第111巻, 7271ページ(1989年)(白金上のイソニトリル) ; MaozおよびSagiv, Langmuir, 第3巻, 1045ページ(1987年)(シリカ上のシラン) ; MaozおよびSagiv, Langmuir, 第3巻, 1034ページ(1987年)(シリカ上のシラン) ; Wassermanら, Langmuir, 第5巻, 1074ページ(1989年)(シリカ上のシラン) ; EltekovaおよびEltekov, Langmuir, 第3巻, 951ページ(1987年)(二酸化チタンおよびシリカ上の芳香族カルボン酸、アルデヒド、アルコールおよびメトキシ基) ; Leclerc, J. Phys. Chem., 第92巻, 2597ページ(1988年)(金属上の硬質ホスフェート)。

【0069】

環式ジスルフィドで官能化されたオリゴヌクレオチドは本発明の範囲内にある。環式ジスルフィドは、好ましくは、その環の中に2つの硫黄原子を含めて5または6つの原子を有している。適切な環式ジスルフィドは市販されているか、既知の方法によって合成される。環式ジスルフィドの還元形も使用することができる。

【0070】

好ましくは、リンカーは、環式ジスルフィドに付けられた炭化水素部分をさらに含む。適切な炭化水素は市販されており、環式ジスルフィドに付けられる。好ましくは炭化水素部分はステロイド残基である。環式ジスルフィドに付けられたステロイド残基を含むリンカーを使用して調製されたオリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体は、期せずしてアルカンチオールまたは非環式ジスルフィドをリンカーとして使用して調製した共役体と比較して、チオール(例えばボリメラーゼ連鎖反応(PCR)溶液中で使用するジチオスレイトール)に対して著しく安定であることが分かった。確かに、本発明のオリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体は300倍安定していることがわかった。この予期しなかった安定性は、恐らく各オリゴヌクレオチドが、1つの硫黄原子ではなく、2つの硫黄原子によってナノ粒子に固定されているという事実による。詳しく説明すると、環式ジスルフィドの2つの隣接した硫黄原子が、オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体の安定化に有効なキレート化効果を有することが考えられる。リンカーの大きな疎水性ステロイド残基も、ナノ粒子の表面への水溶性分子の接近からナノ粒子を遮ることにより、共役体の安定性に寄与するように思われる。

【0071】

以上を考慮すると、両方の硫黄原子がナノ粒子に同時にくっつくことができるように、環式ジスルフィドの2つの硫黄原子は好ましくは十分に接近しなければならない。より好ましくは、2つの硫黄原子は互いに隣接する。また、炭化水素部分は、ナノ粒子の表面を遮る大きな疎水性表面を示すように大きくなくてはならない。

【0072】

環式ジスルフィドリンカーを使用したオリゴヌクレオチド-環式ナノ粒子共役体は、核酸検出用の診断アクセシや本明細書に記載したナノファブリケーションの方法において、グループとして使用され得る。本発明のそのような共役体は、それを使用した診断アクセシの感度を向上させることが期せずして分かった。特に、環式ジスルフィドに付けられたステロイド残基を含むリンカーを使用して調製されたオリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体を使用したアクセシは、約10倍アルカンチオールまたは非環式ジスルフィドをリンカーとして使用して調製された共役体を使用したアクセシよりも10倍感度が高いと分かった。

【0073】

上記のチオールに対する本発明のオリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体の驚くべき安定性

10

20

30

40

50

は、それらをPCR溶液中で直接使用することを可能にする。したがって、PCRによって増幅されるDNA標的に対してプローブとして加えられた本発明のオリゴヌクレオチド-ナノ粒子は、30または40回のPCRの加熱-冷却サイクルを受け、チューブを開かなくてもなおアンプリコンを検出することができる。PCR後にプローブ追加のためにサンプルチューブを開くと、後のテストに使用する機器の汚染による深刻な問題が起こる可能性がある。

【0074】

最後に、本発明は、本発明のある種類のオリゴヌクレオチド環式ジスルフィドリンカーが入った容器または本発明のある種類のオリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体が入った容器を含むキットを提供する。該キットは、核酸検出またはナノファブリケーションに有効な他の試薬や品目をさらに含んでもよい。

【0075】

各ナノ粒子には多数のオリゴヌクレオチドが付着する。その結果、各ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体は、相補的配列を有する多数のオリゴヌクレオチドまたは核酸に結合し得る。

【0076】

本発明の実施に際して、規定配列を有するオリゴヌクレオチドが様々な目的に使用される。予め決定した配列を有するオリゴヌクレオチドを調製する方法は周知である。例えば、Sambrookら、*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (第2版, 1989年) および F. Eckstein (編) *Oligonucleotides and Analogues*, 第1版 (Oxford University Press, New York, 1991年) 参照。オリゴヌクレオチドとオリゴデオキシリボヌクレオチドの合成には、共に固相合成法が好ましい(周知のDNA合成法は、RNAの合成にも有用である)。オリゴリボヌクレオチドとオリゴデオキシリボヌクレオチドは、酵素的に調製することもできる。

【0077】

本発明は核酸検出法を提供する。これらの方法はまた、どの種類の核酸をも検出し得るし、例えば、病気の診断や核酸の配列決定にも用い得る。本発明の方法により検出し得る核酸の例としては、遺伝子(例えば、特定の疾患に関与する遺伝子)、ウイルスRNAおよびDNA、細菌DNA、菌類DNA、cDNA、mRNA、RNAおよびDNAフラグメント、オリゴヌクレオチド、合成オリゴヌクレオチド、修飾オリゴヌクレオチド、一本鎖および二本鎖核酸、天然および合成核酸などがある。例えば、核酸検出法の用途例には、ウイルス性疾患(例えば、ヒト免疫不全ウイルス、肝炎ウイルス、ヘルペスウイルス、サイトメガロウイルスおよびエプスタイン-バーウイルス)、細菌性疾患(例えば、結核、ライム病、H.ピロリ、大腸菌感染症、レジオネラ感染症、マイコプラズマ感染症、サルモネラ感染症) 性的伝染病(例えば、淋病)、遺伝性疾患(例えば、囊胞性線維症、デュシェンヌ型筋ジストロフィー、フェニルケトン尿症、鎌状赤血球貧血)、ならびにガン(例えば、ガン発症に関与する遺伝子)の診断および/またはモニター用; 法医学用; DNA配列決定用; 親子鑑定テスト用; 細胞系確認用; 遺伝子療法のモニター用; ならびに他の多くの目的が含まれる。

【0078】

肉眼による変色の観察に基づく核酸検出法は、安価、高速、簡単、強靱(試薬が安定している)であり、特殊化装置または高価な装置を必要とせず、かつ計器による計測がほとんど不要である。これらの点から、上記方法は、例えば、DNA配列決定における研究および解析実験において、特定病原体の存在を検出する分野において、治療薬の処方支援するために感染症の迅速な同定を必要とする医院において、また費用のかららない最前線のスクリーニングをするために家庭や保険センターにおいて用いるのに特に適している。

【0079】

検出すべき核酸は、公知方法で単離することもできるし、細胞、組織試料、生物流体(例えば、唾液、尿、血液、血清)、PCR成分を含有する溶液、大過剰量のオリゴヌクレオ

10

20

30

40

50

チドまたは高分子量DNAを含有する溶液、および当該技術分野においても既知の他の試料中で直接検出することもできる。例えば、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, 1989年) ならびにB. D. HamesおよびS. J. Higgins編, Gene Probes 1 (IRL Press, New York, 1995年) 参照。ハイブリダイズ用プローブを用いて検出するための核酸の調製法は当該技術分野では周知である。例えば、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, 1989年) ならびにB. D. HamesおよびS. J. Higgins編, Gene Probes 1 (IRL Press, New York, 1995年) 参照。

【0080】

核酸が少量で存在する場合、当該技術分野において公知の方法を用い得る。例えば、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, 1989年) ならびにB. D. HamesおよびS. J. Higgins編, Gene Probes 1 (IRL Press, New York, 1995年) 参照。ポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) 増幅が好ましい。

【0081】

本発明の1つの核酸検出法は、核酸とオリゴヌクレオチドが付着している1つ以上の種類のナノ粒子とを接触させるステップを含む。検出すべき核酸は少なくとも2つの部分を有している。これらの部分の長さ、もしあれば、それらの間隔は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが核酸とハイブリダイズしたときに検出可能な変化が生じるように選択される。これらの長さと同隔は、経験的に決定可能であり、用いられる粒子の種類およびそのサイズ、ならびにアッセイに用いられる溶液中に存在する電解質の種類 (当該技術分野では公知のように、ある種の電解質は、核酸のコンホメーションに影響を与える) に依存するのである。

【0082】

また、核酸を他の核酸の存在下に検出しようとする場合、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドが結合すべき核酸部分は、核酸の検出を特異的にするのに十分なユニーク配列を含むように選択しなければならない。そのようにするためのガイドラインは当該技術分野では周知である。

【0083】

核酸は、1種類のオリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体を用いればすむように互いに十分に近接した反復配列を含んでいることがあるが、このようなことはめったに起こらない。一般に、核酸の選択した複数の部分は異なる配列を有し、好ましくは異なるナノ粒子に付着している。該選択部分は、2つ以上の異なるオリゴヌクレオチドを担持するナノ粒子と接触することになる。核酸を検出するための系の1つの例が図2に示されている。図で分るように、第1ナノ粒子に付着している第1オリゴヌクレオチドは、一本鎖DNA中の標的配列の第1部分に対して相補的な配列を有している。第2ナノ粒子に付着している第2オリゴヌクレオチドは、一本鎖DNA中の標的配列の第2部分に対して相補的な配列を有している。DNAの追加部分是对应ナノ粒子の標的となり得る。図17参照。核酸のいくつかの部分を標的のすると、検出可能な変化の大きさが増大する。

【0084】

ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と核酸との接触ステップは、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸の標的配列とをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に行う。これらのハイブリダイゼーション条件は、当該技術分野では周知であり、用いられる特定の系に合わせて容易に最適化し得る。例えば、Sambrookら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版, 1989年) 参照。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件を用いるのが好ましい。

【0085】

検出すべき核酸とナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を含有する溶液を凍結解凍するこ

10

20

30

40

50

とにより、ハイブリダイゼーションをより高速にすることができる。溶液は、ドライアイス—アルコール浴中に凍結させるのに十分な時間（一般に、 $100\mu\text{l}$ の溶液の場合、約1分）入れる方法などの任意の慣用法で凍結し得る。溶液は、熱変性温度より低い温度で解凍しなければならないが、ナノ粒子—オリゴヌクレオチド共役体と核酸とのほとんどの組合せに対しては、室温が好都合であろう。溶液の解凍後、ハイブリダイゼーションが完了し、溶液解凍後に検出可能な変化が観察される。

【0086】

検出すべき核酸およびナノ粒子—オリゴヌクレオチド共役体を含有する溶液を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと標的核酸とで形成された複合体の解離温度（ T_m ）より低い温度まで温めて、ハイブリダイゼーション速度を増大させることもできる。あるいは、解離温度（ T_m ）以上に加熱し、溶液を冷却することにより、高速ハイブリダイゼーションを達成することもできる。

【0087】

ハイブリダイゼーションの速度は、塩濃度を（例えば、 0.1M から 0.3M NaCl ）に高めることにより、増大させることも可能である。

ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸とがハイブリダイズすると生じる検出可能な変化は、変色、ナノ粒子凝集体の形成、または凝集したナノ粒子の沈殿であり得る。変色は、肉眼または分光分析により観察し得る。ナノ粒子凝集体の形成は、電子顕微鏡検査または比濁分析によって観察し得る。凝集したナノ粒子の沈殿は、肉眼でも顕微鏡検査によっても観察し得る。好ましいのは、肉眼で観察し得る変化である。特に好ましいのは、肉眼で観察し得る変色である。

【0088】

肉眼による変色の観察は、対照的な色を背景にするより容易に実施し得る。例えば、金ナノ粒子を用いる場合、変色の観察は、（シリカまたはアルミナTLCプレート、濾紙、セルロイドメンブレン、およびナイロンメンブレン、好ましくはC-18シリカTLCプレートなどの）固体白色表面上にハイブリダイゼーション溶液をスポットし、スポットを乾燥させることにより容易になる。初めは、スポットは、（ハイブリダイゼーション不在下のピンク／赤色から、ハイブリダイゼーション存在下の紫がかった赤／紫色の範囲の）ハイブリダイゼーション溶液の色を呈する。室温下または 80°C （温度は重要ではない）下に乾燥させたとき、ナノ粒子—オリゴヌクレオチド共役体がスポットする前に標的核酸とハイブリダイズして結合していると、青色スポットが生じる。（例えば、標的核酸が存在しないために）ハイブリダイゼーションが起らないと、スポットはピンク色である。青色スポットとピンク色スポットは安定であり、のちに冷却しても、加熱しても、経時的にも、変化しない。それらのスポットはテストの便利な永久記録を提供する。変色を観察するのに、（ハイブリダイズしたナノ粒子—オリゴヌクレオチド共役体とハイブリダイズしていないものの分離などの）他のステップは不要である。

【0089】

アッセイ結果を容易に視覚化するための代替法は、液体を吸引してフィルターに通過させながら、標的核酸にハイブリダイズしたナノ粒子プローブ試料をガラス繊維フィルター（例えば、サイズが 13nm の金ナノ粒子と共に用いる場合には、細孔サイズ $0.7\mu\text{m}$ 、グレードFG75のホウケイ酸塩マイクロファイバーフィルター）に対してスポットする方法である。その後、（フィルターの細孔より大きいために保持された）ナノ粒子プローブと標的核酸とのハイブリダイゼーションにより生成した凝集体を含む観察可能なスポットを残して、過剰なハイブリダイズしていないプローブをフィルターに通して水で洗い流す。この技術は、過剰なナノ粒子プローブを使用し得るので、高い感度を提供し得る。残念ながら、ナノ粒子プローブは、試みた他の多くの固体表面（シリカスライド、逆相プレート、ナイロン、ニトロセルロース、セルロースおよび他のメンブレン）には粘着するために、これらの表面は使用できない。

【0090】

図2に示されている検出系の重要な側面は、検出可能な変化を得るステップが、2つの異

10

20

30

40

50

なるオリゴヌクレオチドと核酸中の所与の標的配列との協同ハイブリダイゼーションによって決まることである。2つのオリゴヌクレオチドのいずれにおける誤対合も、粒子間の結合を不安定にするであろう。塩基対における誤対合が、長いオリゴヌクレオチドプローブの結合よりも短いオリゴヌクレオチドプローブの結合に対してはるかに大きな不安定化作用を及ぼすことは周知である。図2に示されている系の利点は、この系が、長い標的配列およびプローブ（図2に示されている実施例では18塩基対）に関連する塩基識別を利用するにも拘わらず、短いオリゴヌクレオチドプローブ（図2に示されている実施例では9塩基対）に特徴的な感度を有することである。

【0091】

核酸の標的配列は、図2のように連続的なこともあるし、図3に示されているように、標的配列の2つの部分がナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと相補的ではない第3部分によって分離されていることもある。後者の場合、溶液中で遊離すると共にこの第3部分の配列に対して相補的な配列を有する、フィラー（filler、充填）オリゴヌクレオチドを用いるというオプションもある（図3参照）。フィラーオリゴヌクレオチドが核酸の第3部分とハイブリダイズすると、二本鎖セグメントができ、それによってナノ粒子間の平均間隔が変化し、その結果、色が変わる。図3に示されている系は、検出法の感度を高め得る。

【0092】

核酸検出法の実施態様のなかには基板を利用するものもある。基板を用いることにより、検出可能な変化（シグナル）を増幅し、アッセイの感度を高めることができる。

【0093】

検出可能な変化を観察し得る任意の基板を用いてよい。適当な基板としては、透明固体表面（例えば、ガラス、石英、プラスチックおよび他のポリマー類）、不透明固体表面（例えば、TLCシリカプレート、濾紙、ガラス繊維フィルター、セルロイドメンブレン、ナイロンメンブレンなどの白色固体表面）、および導電性固体表面（例えば、インジウムスズオキシド（ITO））が挙げられる。基板は、任意の形状または厚さであってよいが、一般的には、平坦で薄い。好ましいのは、ガラス（例えば、ガラス製スライド）またはプラスチック（例えば、マイクロタイタープレートのウエル）などの透明な基板である。

【0094】

1つの実施態様において、オリゴヌクレオチドを基板に付着させる。オリゴヌクレオチドは、例えば、Chrisseyら、Nucleic Acids Res.、第24巻、3031-3039ページ（1996年）；Chrisseyら、Nucleic Acids Res.、第24巻、3040-3047ページ（1996年）；Mucicら、Chem. Commun.、第555巻（1996年）；ZimmermannおよびCox、Nucleic Acids Res.、第22巻、492ページ（1994年）；Bottomleyら、J. Vac. Sci. Technol. A、第10巻、591ページ（1992年）；およびHegnerら、FEBS Lett.、第336巻、452ページ（1993年）に記載のように、基板に付着させることができる。

【0095】

基板に付着しているオリゴヌクレオチドは、検出すべき核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有している。核酸と基板とを、基板上のオリゴヌクレオチドと核酸とをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に接触させる。このようにして、核酸は基板と結合した状態になる。結合しなかった核酸は、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を加える前に基板から洗い流すのが好ましい。

【0096】

次いで、基板に結合した核酸と、オリゴヌクレオチドが付着している第1種類のナノ粒子とを接触させる。オリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有しており、接触ステップは、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸とをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に行う。このようにして、第1種類のナノ粒子は基板に結合し

た状態になる。ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を基板に結合させた後、基板を洗浄して、結合していないナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体および核酸を除去する。

【0097】

第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、すべて同じ配列を有してもよいし、検出すべき核酸の異なる部分とハイブリダイズする異なる配列を有してもよい。異なる配列を有するオリゴヌクレオチドを用いる場合、各ナノ粒子に、すべての異なるオリゴヌクレオチドが付着してもよいが、異なるオリゴヌクレオチドが異なるナノ粒子に付着するのが好ましい。図17は、核酸の複数の部分にハイブリダイズするように設計されたナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体の使用を示している。代わりに、各第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは複数の異なる配列を有していてもよいが、そのうちの少なくとも1つは、検出すべき核酸の一部とハイブリダイズしなければならない(図25B参照)。

【0098】

最後に、基板に結合した第1種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と、オリゴヌクレオチドが付着している第2種類のナノ粒子とを接触させる。該オリゴヌクレオチドは、第1種類のナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドの少なくとも一部の配列に対して相補的な配列を有しており、接触ステップは、第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に行う。ナノ粒子を結合させた後、結合しなかったナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を除去するために基板を洗浄するのが好ましい。

【0099】

ハイブリダイゼーションの組合せにより、検出可能な変化が生じる。検出可能な変化は上述のものと同じであるが、但し、多重ハイブリダイゼーションにより、検出可能な変化が増幅される。特に、各第1種類のナノ粒子には、(同一または異なる配列を有する)複数のオリゴヌクレオチドが付着しているため、各第1種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体は、複数の第2種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体にハイブリダイズし得る。また、第1種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体は、検出すべき核酸の2つ以上の部分にハイブリダイズし得る。多重ハイブリダイゼーションにより得られる増幅は、変化を初めて検出し得るものとしたり、または検出可能な変化の大きさを増大させたりし得る。この増幅によって、アッセイの感度が高められ、少量の核酸の検出が可能になる。

【0100】

所望の場合には、第1および第2種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を連続付加して、追加のナノ粒子層を堆積することができる。この方法で、標的核酸1分子当たりの固定化ナノ粒子の数を増加させると同時に、対応するシグナル強度を増強させることができる。

【0101】

また、互いに直接ハイブリダイズするように設計された第1および第2種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体の代わりに、連続オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの結果としてナノ粒子を共に結合させる働きをするオリゴヌクレオチドを担持するナノ粒子を用いてもよい。

【0102】

ナノ粒子およびオリゴヌクレオチドの調製法ならびにオリゴヌクレオチドをナノ粒子に付着させる方法は上記に説明されている。ハイブリダイゼーション条件は当該技術分野では周知であり、用いられる特定の系に合わせて容易に最適化し得る(上記参照)。

【0103】

この核酸(検体DNA)検出法の1つの実施例が図13Aに示されている。図に示されているように、ハイブリダイゼーションの組合せにより、ナノ粒子凝集体が検体DNAを介して基板に結合している暗色領域が生じる。これらの暗色領域は、周囲光を使って肉眼で、好ましくは白い背景を背に基板を見れば容易に観察し得る。図13Aから容易に分るように、この方法は、検出可能な変化を増幅させる手段を提供する。

【0104】

10

20

30

40

50

この核酸検出法の別の実施例が図25Bに示されている。図13Aに示されている実施例と同じように、ハイブリダイゼーションの組合せにより、ナノ粒子凝集体が検体DNAを介して基板に結合している暗色領域ができ、これは肉眼で観察することができる。

【0105】

別の実施態様では、ナノ粒子を基板に付着させる。ナノ粒子は、例えば、Grabarra, *Analyt. Chem.*, 第67巻, 73-743ページ(1995年); Bethellら, *J. Electroanal. Chem.*, 第409巻, 137ページ(1996年); Barら, *Langmuir*, 第12巻, 1172ページ(1996年); Olivinら, *J. Am. Chem. Soc.*, 第114巻, 5221ページ(1992年)に記載のように基板に付着させることができる。

【0106】

ナノ粒子を基板に付着させた後、オリゴヌクレオチドをナノ粒子に付着させる。これは、溶液中でオリゴヌクレオチドをナノ粒子に付着させるための上記方法と同じ方法で達成し得る。ナノ粒子に付着したオリゴヌクレオチドは、核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有している。

【0107】

基板と核酸とを、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸とをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に接触させる。このようにして、核酸は基板に結合した状態になる。結合しなかった核酸は、さらにナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を加える前に基板から洗い流すのが好ましい。

【0108】

次いで、オリゴヌクレオチドが付着している第2種類のナノ粒子を用意する。これらのオリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有しており、基板に結合した核酸と第2種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体とを、第2種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体上のオリゴヌクレオチドと核酸とをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に接触させる。このようにして、第2種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体は基板と結合した状態になる。ナノ粒子を結合させた後、結合しなかったナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と核酸を基板から洗い流す。この時点で、ある変化(例えば、変色)を検出し得る。

【0109】

第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドはすべて同じ配列を有してもよいし、検出すべき核酸の異なる部分とハイブリダイズする異なる配列を有してもよい。異なる配列を有するオリゴヌクレオチドを用いる場合、各ナノ粒子に、すべての異なるオリゴヌクレオチドが付着してもよいが、異なるオリゴヌクレオチドが異なるナノ粒子に付着するのが好ましい。図17を参照されたい。

【0110】

次いで、第1部分が第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部の配列と相補的である少なくとも2つの部分を含む選択された配列を有する結合オリゴヌクレオチドと、基板に結合した第2種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体とを、結合オリゴヌクレオチドとナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に接触させる。このようにして、結合オリゴヌクレオチドは基板と結合した状態になる。結合オリゴヌクレオチドを結合させた後、結合しなかった結合オリゴヌクレオチドを基板から洗い流す。

【0111】

最後に、オリゴヌクレオチドが付着している第3種類のナノ粒子を用意する。これらのオリゴヌクレオチドは、結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列に対して相補的な配列を有している。ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と、基板に結合した結合オリゴヌクレオチドとを、結合オリゴヌクレオチドとナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に接触させる。ナノ粒子を結合させた後、結合しなかったナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を基板から洗い流す。

10

20

30

40

50

【0112】

ハイブリダイゼーションの組合せにより、検出可能な変化が生じる。検出可能な変化は上述のものと同じであるが、但し、多重ハイブリダイゼーションにより、検出可能な変化が増幅される。特に、各第2種類のナノ粒子には、(同一または異なる配列を有する)多数のオリゴヌクレオチドが付着するので、各第2種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体は、(結合オリゴヌクレオチドを介して)複数の第3種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体にハイブリダイズし得る。また、第2種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体は、検出すべき核酸の2つ以上の部分にハイブリダイズし得る。多重ハイブリダイゼーションによりもたらされる増幅は、変化を初めて検出可能なものとしたり、または検出可能な変化の大きさを増大させたりし得る。この増幅により、アッセイの感度が高められ、少量の核酸の検出が可能になる。

10

【0113】

所望の場合には、結合オリゴヌクレオチドと第2および第3種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体とを連続付加して、追加のナノ粒子層を堆積することができる。このようにして、標的核酸1分子当たりの固定化ナノ粒子の数をさらに増強させると同時に、対応するシグナル強度を増強させることができる。

【0114】

また、結合オリゴヌクレオチドの使用を排除することも可能であり、第2および第3種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体は、直接互いにハイブリダイズするように設計し得る。

20

【0115】

ナノ粒子およびオリゴヌクレオチドの調製法ならびにオリゴヌクレオチドをナノ粒子に付着させる方法は上記に説明されている。ハイブリダイゼーション条件は当該技術分野では周知であり、用いられる特定の系に合わせて容易に最適化し得る(上記参照)。

【0116】

この核酸(検体DNA)検出法の1つの実施例が図13Bに示されている。その図に示されているように、ハイブリダイゼーションの組合せにより、ナノ粒子凝集体が検体DNAを介して基板に結合している暗色領域が生じる。これらの暗色領域は、上述したように肉眼で容易に観察し得る。図13Bから分るように、本発明の方法のこの実施態様は、検出可能な変化を増幅させる別の手段を提供する。

30

【0117】

別の増幅計画はリボソームの使用である。この計画では、オリゴヌクレオチドを基板に付着させる。適当な基板は上述のものであり、オリゴヌクレオチドは上述のように基板に付着させることができる。例えば、基板がガラスの場合、これは、ホスホリルまたはカルボン酸基を介してオリゴヌクレオチドを基板表面上のアミノアルキル基に縮合させることにより達成し得る(関連化学に関しては、Grabarra, Anal. Chem., 第67巻, 735-743ページ(1995年)参照)。

【0118】

基板に付着したオリゴヌクレオチドは、検出すべき核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有している。核酸と基板とを、基板上のオリゴヌクレオチドと核酸とをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に接触させる。このようにして、核酸は基板と結合した状態になる。結合しなかった核酸は、この系の追加成分を加える前に基板から洗い流すのが好ましい。

40

【0119】

次いで、基板に結合した核酸をオリゴヌクレオチドが付着しているリボソームと接触させる。オリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有しており、接触ステップは、リボソーム上のオリゴヌクレオチドと核酸とをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に行う。このようにして、リボソームは基板と結合した状態になる。リボソームを基板に結合させた後、基板を洗浄して、結合しなかったリボソームと核酸を除去する。

50

【0120】

リボソーム上のオリゴヌクレオチドはすべて同じ配列を有してもよいし、検出すべき核酸の異なる部分とハイブリダイズする異なる配列を有してもよい。異なる配列を有するオリゴヌクレオチドを用いる場合、各リボソームに、すべての異なるオリゴヌクレオチドが付着するか、異なるオリゴヌクレオチドが異なるナノ粒子に付着し得る。

【0121】

オリゴヌクレオチド-リボソーム共役体を調製するために、オリゴヌクレオチドを、コレステリルなどの疎水基に結合させ (Lettingerら, J. Am. Chem. Soc., 第115巻, 7535-7536ページ (1993年) 参照)、疎水基-オリゴヌクレオチド共役体をリボソーム溶液と混合して、疎水基-オリゴヌクレオチド共役体が膜に固定化された状態のリボソームを形成する (Zhangら, Tetrahedron Lett., 第37巻, 6243-6246ページ (1996年) 参照)。リボソーム表面上での疎水基-オリゴヌクレオチド共役体の充填は、混合物中の疎水基-オリゴヌクレオチド共役体とリボソームの比率を調節することにより制御し得る。コレステリル側基の疎水性相互作用によって付着しているオリゴヌクレオチドを担持するリボソームは、ニトロセルロース膜上に固定化されたポリヌクレオチドを標的とするのに有効であることが認められた (同上)。リボソーム膜内に固定化されたフルオレセイン基をレポーター基として用いた。フルオレセイン基は効果的な働きをしたが、(例えば、リボソーム表面上の) 高局所濃度領域のフルオレセイン由来のシグナルが自己消光により弱められるという事実により感度が制限される。

【0122】

リボソームは当該技術分野で周知の方法により調製される。Zhangら, Tetrahedron Lett., 第37巻, 6243ページ (1996年) 参照。一般にリボソームの大きさは、サイズ (直径) が、後続ステップで用いられるナノ粒子の約5~50倍である。例えば、直径約13 nmのナノ粒子には、直径約100 nmのリボソームを用いるのが好ましい。

【0123】

基板に結合したリボソームと、少なくとも1つの第1種類のオリゴヌクレオチドが付着している第1種類のナノ粒子とを接触させる。第1種類のオリゴヌクレオチドのナノ粒子に付着していない末端には疎水基が付着しており、接触ステップは、疎水性相互作用の結果として、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドをリボソームに付着させるのに有効な条件下に行う。この時点で、検出可能な変化を観察し得る。

【0124】

この方法はさらに、リボソームに結合した第1種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体とオリゴヌクレオチドが付着している第2種類のナノ粒子とを接触させるステップを含む。第1種類のナノ粒子には、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着しており、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、第1種類のナノ粒子上の第2種類のオリゴヌクレオチドの少なくとも一部の配列に対して相補的な配列を有している。接触ステップは、第1および第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に行う。このハイブリダイゼーションは、一般に、穏和な温度 (例えば、5~60℃) 下に実施され、したがって、室温下にハイブリダイゼーションを導き得る条件 (例えば、0.3~1.0 M NaCl) が用いられる。ハイブリダイゼーション後、結合しなかったナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を基板から洗い流す。

【0125】

ハイブリダイゼーションの組合せにより、検出可能な変化が生じる。検出可能な変化は上述のものと同じであるが、但し、多重ハイブリダイゼーションにより、検出可能な変化が増幅される。特に、各リボソームには、(同一または異なる配列を有する) 複数のオリゴヌクレオチドが付着しているので、各リボソームは、複数の第1種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体にハイブリダイズし得る。同様に、各第1種類のナノ粒子-オリゴ

クレオチド共役体には、多重オリゴヌクレオチドが付着しているので、各第1種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体は、複数の第2種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体とハイブリダイズし得る。また、リボソームは、検出すべき核酸の2つ以上の部分にハイブリダイズし得る。多重ハイブリダイゼーションによりもたらされる増幅は、変化を初めて検出し得るものとしたり、または検出可能な変化の大きさを増大せたりし得る。この増幅により、アッセイの感度が高められ、少量の核酸の検出が可能になる。

【0126】

所望の場合には、第1および第2種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を連続付加して、追加のナノ粒子層を堆積することができる。この方法で、標的核酸1分子当たりの固定化ナノ粒子の数をさらに増加させると同時に、対応するシグナル強度を増強させることができる。

【0127】

また、互いに直接ハイブリダイズするように設計された第2および第3種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体の代わりに、結合オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションの結果としてナノ粒子を結合させる働きをするオリゴヌクレオチドを担持するナノ粒子を用いてもよい。

【0128】

ナノ粒子およびオリゴヌクレオチドの調製法ならびにオリゴヌクレオチドをナノ粒子に付着させる方法は上記に説明されている。ナノ粒子と結合させるために一方の末端を官能化した、他方の末端に疎水基を有するかまたは有さないオリゴヌクレオチド混合物を、第1種類のナノ粒子上に用いてもよい。平均的なナノ粒子に結合したこれらのオリゴヌクレオチドの相対比は、混合物中の2種のオリゴヌクレオチドの濃度比によって制御される。ハイブリダイゼーション条件は当該技術分野では周知であり、用いられる特定の系に合わせて容易に最適化し得る（上記参照）。

【0129】

この核酸検出法の1つの例が図18に示されている。第1種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体とリボソームとのハイブリダイゼーションにより、検出可能な変化が生じ得る。金ナノ粒子の場合、ピンク/赤色が観察され得るし、ナノ粒子が互いに十分に近接していれば、紫/青色が観察され得る。第2種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と第1種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体がハイブリダイズすると、検出可能な変化が生じる。金ナノ粒子の場合、紫/青色が観察されるであろう。これらの変色はいずれも肉眼で観察し得る。

【0130】

基板を利用するさらに他の実施態様では、「凝集体ブロープ」を用い得る。凝集体ブロープは、相補的オリゴヌクレオチド（aおよびa'）が付着している2種類のナノ粒子をハイブリダイズさせて（図28Aに示されている）コアを形成することにより調製し得る。各種類のナノ粒子には、複数のオリゴヌクレオチドが付着しているので、各種類のナノ粒子は、複数の他の種類のナノ粒子にハイブリダイズし得る。ゆえに、コアは両種類の多数のナノ粒子を含む凝集体である。次いで、コアに、少なくとも2種類のオリゴヌクレオチドが付着している第3種類のナノ粒子でキャップ形成する。第1種類のオリゴヌクレオチドは、検出すべき核酸の一部の配列b'に対して相補的な配列bを有している。第2種類のオリゴヌクレオチドは、第3種類のナノ粒子がコアの外側のナノ粒子にハイブリダイズするように配列aまたはa'を有している。凝集体ブロープは、2つの種類のナノ粒子を利用して調製することもできる（図28B参照）。各種類のナノ粒子には、少なくとも2種類のオリゴヌクレオチドが付着している。2つの種類のナノ粒子それぞれの上に存在する第1種類のオリゴヌクレオチドは、検出すべき核酸の一部の配列b'に対して相補的な配列bを有している。第1種類のナノ粒子上の第2種類のオリゴヌクレオチドは、2つの種類のナノ粒子が互いにハイブリダイズして凝集体ブロープを形成するように第2種類のナノ粒子上の第2種類のオリゴヌクレオチドの配列a'に対して相補的な配列aを有している（図28B参照）。各種類のナノ粒子には、複数のオリゴヌクレオチドが付着してい

10

20

30

40

50

るので、各種類のナノ粒子は、複数の他の種類のナノ粒子とハイブリダイズして、両種類の多数のナノ粒子を含む凝集体を形成するであろう。

【0131】

凝集体プローブは、基板上で実施される上記の任意のアクセス形式における核酸の検出にも利用可能であり、それによって、検出可能な変化を得たり増強したりするために個別のナノ粒子層を堆積する必要がある。検出可能な変化をさらにもって増強するために、2つの種類の凝集体プローブを用いて凝集体プローブ層を堆積することができ、第1種類の凝集体プローブには、他方の種類の凝集体プローブ上のオリゴヌクレオチドと相補的なオリゴヌクレオチドが付着している。特に、凝集体プローブを図28Bに示されているように調製すると、凝集体プローブは、互いにハイブリダイズして多重層を形成し得る。凝集体プローブを利用するいくつかの可能なアクセス形式が図28C-Dに示されている。

例えば、配列cを含む1種類のオリゴヌクレオチドを基板に付着させる(図28C参照)。配列cは、検出すべき核酸の一部の配列c'と相補的である。標的核酸を加え、基板に付着しているオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせた後、凝集体プローブを加え、配列b'を有する標的核酸部分にハイブリダイズさせると、検出可能な変化が生じる。あるいは、まず、溶液中で標的核酸を凝集体プローブとハイブリダイズさせ、その後、基板上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせてもよいし、標的核酸を凝集体プローブと基板上のオリゴヌクレオチドとともに同時にハイブリダイズさせてもよい。別の実施態様では、溶液中で、標的核酸を凝集体プローブおよび別の種類のナノ粒子と反応させる(図28D参照)。この追加種類のナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドのなかには、それらが標的核酸の配列c'にハイブリダイズするように配列cを有しているものがあるし、この追加種類のナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドのなかには、それらが基板に付着している配列d'を有するオリゴヌクレオチドののちにハイブリダイズするように配列dを含んでいるものもある。

【0132】

コア自体も核酸検出用のプローブとして用い得る。1つの可能なアクセス形式が図28Eに示されている。この図に示されているように、配列bを含む1種類のオリゴヌクレオチドを基板に付着させる。配列bは、検出すべき核酸の一部の配列b'と相補的である。標的核酸を基板と接触させ、基板に付着しているオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせる。次いで、別の種類のナノ粒子を加える。この追加種類のナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドのなかには、ナノ粒子が基板に結合している標的核酸とハイブリダイズするように標的核酸の配列c'に対して相補的な配列cを有するものがある。また、追加種類のナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドのなかには、コアプローブ上の配列aおよびa'に対して相補的な配列aまたはa'を含むものがある。コアプローブを加え、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせる。各コアプローブは、コアを含むナノ粒子に付着している配列aおよびa'を有しているので、コアプローブは、互いにハイブリダイズして、基板に付着した多重層を形成して、検出可能な変化を大きく増強させることができる。代替実施態様では、標的核酸を基板と接触させる前に溶液中で追加種類のナノ粒子と接触させるか、標的核酸、ナノ粒子、および基板をすべて同時に接触させる。さらに別の実施態様では、追加種類のナノ粒子を、配列cと配列aまたはa'を共に含む連結オリゴヌクレオチドに置き換え得る。

【0133】

基板を用いると、複数の初期種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体またはオリゴヌクレオチドを、1つの標的核酸中の複数の部分を検出するため、多数の異なる核酸を検出するため、またはその両方の目的のために、基板にアレイ状に付着させることができる。例えば、1つの基板に、各スポットが標的核酸の一部に結合するように設計された、異なる種類のオリゴヌクレオチドまたはオリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体を含む幾列ものスポットを設け得る。1種以上の核酸を含有する試料を各スポットに加え、適切なオリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体、オリゴヌクレオチド-リボソーム共役体、凝集体プローブ、コアプローブおよび結合オリゴヌクレオチドを用いて、上述の方法の1つでアクセス

10

20

30

40

50

の残りの部分を実施する。

【0134】

最後に、基板を用いると、検出可能な変化を生成させたり、銀染色法によって検出可能な変化を強化したりすることができる。銀染色法は、銀の還元を触媒する任意の種類のナノ粒子と共に用い得る。好ましいのは、貴金属（例えば、金および銀）製ナノ粒子である。Bassell, J. Cell Biol., 第126巻, 863-876ページ (1994年); Braun-Howland, Biotechniques, 第13巻, 928-931ページ (1992年) 参照。核酸の検出に用いられているナノ粒子が銀の還元を触媒しない場合、還元を触媒するために、銀イオンと核酸との複合体を形成させ得る。Braun, Nature, 第391巻, 775ページ (1998年) 参照。また、核酸上のリン酸基と反応し得る銀染料は公知である。

【0135】

銀染色法を用いて、上述のものを含めた基板上で実施される任意のアッセイにおける検出可能な変化を生成または増強することができる。特に、銀染色法は、図25Aに示されているものなどの単一種類のナノ粒子を用いるアッセイの感度を著しく増強させることが判明しており、そのために、ナノ粒子層、凝集体ブロープおよびコアブロープを使わずに済むことが多い。

【0136】

基板上で実施される核酸検出アッセイにおいて、検出可能な変化は、光学式スキャナを用いて観察し得る。適当なスキャナには、反射モードで操作し得るコンピュータに文書のスキャンするのに用いられるもの（例えば、平台型スキャナ）、この機能を果たし得るか、または同種類の光学を利用する他のデバイス、任意の種類のグレースケール感受性測定デバイス、および本発明にしたがって基板をスキャンするように改変された標準型スキャナ（例えば、基板用容器を含むように改変された平台型スキャナ）（現在までのところ、透過モードで操作するスキャナを用いるのは不可能であることが判明している）が含まれる。スキャナの解像度は、基板上の反応領域はスキャナの1ピクセルより大きくするの十分に大きくなければならない。スキャナは、任意の基板と共に用い得るが、但し、アッセイによって生じた検出可能な変化は、基板を背景にして観察しなければならない（例えば、銀染色法によって生成したようなグレースポットは、白を背景にすると観察し得るが、灰色を背景にすると観察できない）。スキャナは、白黒スキャナでもよいが、カラースキャナが好ましい。スキャナは、文書をコンピュータにスキャンするのに使用されるタイプの標準型カラースキャナが最も好ましい。そのようなスキャナは安価であり、容易に購入し得る。例えば、Epson Expression 636 (600×600 dpi)、UMAX Astra 1200 (300×300 dpi)、またはMicrotec 1600 (1600×1600 dpi) を用い得る。スキャナは、基板をスキャンして得た画像をプロセスするためのソフトウェアをロードしたコンピュータにつなぐ。ソフトウェアは、容易に購入し得る、Adobe Photoshop 5.1およびCorel Photopaint 8.0などの標準ソフトウェアであってよい。グレースケール測定値計算ソフトウェアを用いることにより、アッセイ結果の定量手段が得られる。このソフトウェアで、カラースポットの色数を得ることもできるし、核酸の存在、核酸の量、またはその両方を定量するために観察することができるスキャン画像（例えば、プリントアウト）を生成することができる。また、実施例5に記載したようなアッセイを初めとするアッセイの感度は、陰性結果を表す色（実施例5では赤色）を陽性結果を表す色（実施例5では青色）から減色して改良することができる。コンピュータは、容易に購入し得る標準パーソナルコンピュータであってよい。このように、標準ソフトウェアがロードされている標準コンピュータにつないだ標準スキャナを用いることにより、アッセイを基板上で実施する際に核酸を検出かつ定量する便利かつ容易で安価な手段が得られる。スキャン画像および計算結果は、その後の参照および使用のために結果の記録を維持するべくコンピュータに記憶させることができる。もちろん、所望の場合には、より精密な機器やソフトウェアを使用することが可能である。

10

20

30

40

50

【0137】

任意の核酸用アッセイに用い得るナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体が、図17D-Eに示されている。この「万能プローブ」(universal probe)には、単一配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。これらのオリゴヌクレオチドは、少なくとも2つの部分を含む配列を有する結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズし得る。第1部分は、ナノ粒子上の少なくとも一部の配列と相補的である。第2部分は、検出すべき核酸の一部の配列と相補的である。同一の第1部分と異なる第2部分を有する複数の結合オリゴヌクレオチドを用いることができ、その場合、「万能プローブ」は、結合オリゴヌクレオチドとハイブリダイズした後、検出すべき核酸の多重部分または異なる核酸標的に結合し得る。

10

【0138】

本発明の他の多くの実施態様において、検出可能な変化は、オリゴヌクレオチド、ナノ粒子、またはその両方を、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと標的核酸とがハイブリダイズすると検出可能な変化を生成する分子(例えば、蛍光分子および染料)で標識することにより生じる。例えば、金属および半導体ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドの、ナノ粒子に付着していない末端には、蛍光分子が付着され得る。金属および半導体ナノ粒子は、公知の蛍光消光物質であり、その消光効果の大きさは、ナノ粒子と蛍光分子との間隔に依存する。ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドは、ハイブリダイズしていない状態では、ナノ粒子と相互作用し、その結果、有意な消光が観察される。蛍光分子は、標的核酸とハイブリダイズすると、ナノ粒子から間隔が離れた状態になり、それによって、蛍光の消光が減少する。図20A参照。オリゴヌクレオチドが長くなるにつれ、少なくとも変化の増大がもはや観察し得ない程度速く蛍光基がナノ粒子表面から離れて移動するまで、蛍光の変化は大きくなる筈である。オリゴヌクレオチドの有用な長さは経験的に決定し得る。蛍光標識オリゴヌクレオチドが付着している金属および半導体ナノ粒子は、溶液中または基板上で実施されるものを含めた上述のいずれのアッセイ形式にも用い得る。

20

【0139】

オリゴヌクレオチドを蛍光分子で標識する方法および蛍光を測定する方法は当該技術分野では周知である。適当な蛍光分子も当該技術分野では周知であり、それにはフルオレセイン、ローダミンおよびテキサスレッドが含まれる。オリゴヌクレオチドは上述のようにナノ粒子に付着するであろう。

30

【0140】

さらに別の実施態様においては、2つの異なる粒子に付着している2つの種類の蛍光標識オリゴヌクレオチドを用い得る。適当な粒子としては、(ポリスチレン粒子、ポリビニル粒子、アクリレートおよびメタクリレート粒子などの)ポリマー粒子、ガラス粒子、ラテックス粒子、セファロースビーズおよび当該技術分野では周知の他の同様な粒子が挙げられる。そのような粒子にオリゴヌクレオチドを付着させる方法は当該技術分野では周知である。Chrisseyら, *Nucleic Acids Research*, 第24巻, 3031-3039ページ(1996年)(ガラス)およびCharreyreら, *Langmuir*, 第13巻, 3103-3110ページ(1997年), Fahyら, *Nucleic Acids Research*, 第21巻, 1819-1826ページ(1993年), Elaissariら, *J. Colloid Interface Sci.*, 第202巻, 251-260ページ(1998年), Kolarovaら, *Biotecniques*, 第20巻, 196-198ページ(1996年)およびWolfら, *Nucleic Acids Research*, 第15巻, 2911-2926ページ(1987年)(ポリマー/ラテックス)参照。特に、多様な官能基がこれらの粒子上に対して利用可能であり、そのような粒子に組み込むことができる。官能基には、カルボン酸、アルデヒド、アミノ基、シアノ基、エチレン基、ヒドロキシル基、メルカプト基などがある。金属および半導体ナノ粒子を含めたナノ粒子を用いてもよい。

40

【0141】

2種の発蛍光団は、供与体および受容体としてdおよびaと称される。そのような組合せ

50

に有用な種々の蛍光分子は当該技術分野では周知であり、例えば、モレキュラー・プローブ社 (Molecular Probes) から入手できる。魅力的な組合せは、供与体としてのフルオレセインと、受容体としてのテキサスレッドである。d および a が付着している2つの種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を標的核酸と混合し、蛍光光度計で蛍光を測定する。d を励起する波長の光で混合物を励起させ、混合物を a 由来の蛍光についてモニターする。ハイブリダイズすると、d と a は近接するであろう (図 2 B 参照)。非金属、非半導体粒子の場合、ハイブリダイゼーションは、蛍光が d のものから a のものにシフトすること、または a の蛍光に加えて d の蛍光が出現することによって示されるであろう。ハイブリダイゼーションがない場合、発蛍光団は離れ過ぎていて有意なエネルギー伝達が起こらず、d の蛍光のみが観察されるであろう。金属および半導体ナノ粒子の場合、ハイブリダイゼーションの欠如は、d または a に帰因する消光による蛍光の欠如によって示されるであろう (上記参照)。ハイブリダイゼーションは a に帰因する蛍光の増大により示される。

【0142】

受容体および供与体蛍光分子で標識されたオリゴヌクレオチドが付着している上述の粒子およびナノ粒子は、溶液中および基板上で実施されるものを含めた上述のアッセイ形式に使用し得る。溶液形式の場合、オリゴヌクレオチド配列は、図 15 A-G に示されているように標的核酸に結合するように好ましくは選択する。図 13 A-B および図 18 に示されている形式では、結合オリゴヌクレオチドを使って、2つのナノ粒子上の受容体および供与体蛍光分子を近接させ得る。また、図 13 A に示されている形式では、基板に付着しているオリゴヌクレオチドは d で標識し得る。さらに、蛍光分子以外の他の標識、例えば、ハイブリダイズすると検出可能なシグナルを生成するかまたは検出可能なシグナルに変化をもたらす化学発光分子を用いてもよい。

【0143】

本発明の検出法の別の実施態様は、(図 21 に示されている) 蛍光および変色の検出を利用する極めて感度の高い系である。この系は、蛍光分子で標識したオリゴヌクレオチドを付着させたラテックスミクロスフェアと、オリゴヌクレオチドを付着させた金ナノ粒子とを用いる。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体は、上述のように調製し得る。オリゴヌクレオチドをラテックスミクロスフェアに付着させる方法 (例えば、Charreyre, Langmuir, 第13巻, 3103-3110ページ (1997年); Elaissari, J. Colloid Interface Sci., 第202巻, 251-260ページ (1998年) 参照) は、オリゴヌクレオチドを蛍光分子で標識する方法 (上記参照) と同様周知である。ラテックスミクロスフェア上のオリゴヌクレオチドと金ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、標的核酸の配列の異なる部分とハイブリダイズし得るが互いにはハイブリダイズし得ない配列を有している。ラテックスミクロスフェアおよび金ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に対して相補的な配列を含む標的核酸と2つのプローブを接触させると、網目構造が形成される (図 21 参照)。金ナノ粒子の消光特性のために、ラテックスミクロスフェアに付着しているオリゴヌクレオチドの蛍光は、この網目構造の一部の間で消光される。実際、金ナノ粒子は極めて大きい吸収係数を有しているために、1つの金ナノ粒子が多くの発蛍光団分子を消光し得る。したがって、核酸および2種の粒子を含有する溶液の蛍光をモニターして結果を検出することが可能であり、蛍光の減少または排除は陽性結果を示す。しかし、アッセイ結果は、溶液の小滴を微孔質材料上に並べて検出するのが好ましい (図 21 参照)。微孔質材料は、金ナノ粒子のピンク/赤色を検出できる透明またはカラー (例えば、白) でなければならない。また、微孔質材料は、微孔質材料を洗浄したときに、金ナノ粒子が細孔を通過し得る程大きく、かつ微孔質材料表面上のラテックスミクロスフェアを保持するのに十分な程小さい細孔サイズをも有していなければならない。したがって、そのような微孔質材料を用いる場合、ラテックスミクロスフェアのサイズ (直径) は、金ナノ粒子のサイズ (直径) より大きくなければならない。また、微孔質材料は生物媒体に対して不活性でなければならない。多くの適当な微孔質材料は当該技術分野では公知であり、そのような材料としては、種々の

10

20

30

40

50

フィルターや膜、例えば、改質ポリフッ化ビニリデン（ミリポア社（Millipore Corp.）から市販されているDuraporeTMメンブレンフィルターなどのPVDF）や、（ミクロン・セパレーションズ社（Micron Separations Inc.）から市販されているAcetate PlusTMメンブレンフィルターなどの）純粋酢酸セルロースが挙げられる。そのような微孔質材料は、標的核酸と2種のプローブからなる網目構造を保持し、陽性結果（標的核酸の存在）は、（金ナノ粒子の存在に帰する）赤/ピンク色と、（金ナノ粒子による蛍光の消光に帰する）蛍光の欠如によって証明される（図21参照）。陰性結果（標的核酸の不在）は、微孔質材料を洗浄したときに金ナノ粒子が微孔質材料の細孔を通過し（したがって、蛍光の消光が起こらない）、かつ白色ラテックスミクロスフェアがその上に捕捉されるために、白色および蛍光によって証明される（図21参照）。さらに、陽性結果の場合、蛍光および変色は温度の関数として観察し得る。例えば、温度を上昇させて行くと、デハイブリダイゼーション温度に達すると同時に蛍光が観察されるであろう。したがって、温度の関数として色または蛍光を見れば、オリゴヌクレオチドプローブと標的核酸との相補性の程度についての情報を得ることができる。上述のように、この検出法は高感度を示す。長さ24塩基の3 fmol（フェムトモル）の一本鎖標的核酸と、長さ24塩基の20 fmolの二本鎖標的核酸という少量が、肉眼で検出された。この方法は、その使用方法も極めて簡単である。蛍光は、ただUVランプで溶液または微孔質材料を照明するだけで生成させることができ、蛍光シグナルおよび比色シグナルは肉眼でモニターし得る。代わりに、より定量的な結果を得るために、蛍光光度計を前面モード（front-face mode）を用いて、短経路長で溶液の蛍光を測定してもよい。

【0144】

上記実施態様は、特に、ラテックスミクロスフェアおよび金ナノ粒子に関連して説明した。これらの粒子の代わりに、上述の他の特性を有すると共にオリゴヌクレオチドを付着させ得る任意の他のミクロスフェアまたはナノ粒子を用いてもよい。多くの適当な粒子およびナノ粒子が、それらにオリゴヌクレオチドを付着させる方法と共に上述されている。さらに、他の測定可能な特性を有するミクロスフェアおよびナノ粒子も用い得る。例えば、ポリマーを蛍光、色または電気化学的活性などの任意の所望特性を有するように改質し得るポリマー改質粒子およびナノ粒子を用いてもよい。Watsonら、J. Am. Chem. Soc., 第1121巻, 462-463ページ（1999年）（ポリマー改質金ナノ粒子）。また、磁性粒子、ポリマーコート磁性粒子、および半導体粒子も使用し得る。Chanら、Science, 第281巻, 2016ページ（1998年）；Brucherら、Science, 第281巻, 2013ページ（1998年）；Kolarovaら、Biotechniques, 第20巻, 196-198ページ（1996年）参照。

【0145】

さらに別の実施態様において、蛍光分子で標識したオリゴヌクレオチドが付着している金属または半導体ナノ粒子を含む2つのプローブを用いる（図22に示されている）。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体は、上述のように調製しかつ蛍光分子で標識し得る。2つの種類のオリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体上のオリゴヌクレオチドは、標的核酸の配列の異なる部分とハイブリダイズし得るが互いにはハイブリダイズし得ない配列を有している。ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に対して相補的な配列を含む標的核酸を2つのプローブと接触させると、網目構造が形成される（図22参照）。金属または半導体ナノ粒子の消光特性のために、ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドの蛍光は、この網目構造の一部の間で消光される。したがって、核酸および2つのプローブを含有する溶液の蛍光をモニターして結果を検出することが可能であり、蛍光の減少または排除は陽性結果を示す。しかし、アッセイ結果は、溶液の小滴を微孔質材料上に並べて検出するのが好ましい（図22参照）。微孔質材料は、洗浄したときに、ナノ粒子がその細孔を通過し得る程大きくかつその表面上に網目構造を保持するのに十分な程小さい細孔サイズを有していなければならない（図22参照）。多くの適当な微孔質材料が当該技術分野では

公知であり、そのような材料には上述のものが含まれる。そのような微孔質材料は、標的核酸と2つのプローブとからなる網目構造を保持し、陽性結果（標的核酸の存在）は、（金属または半導体ナノ粒子による蛍光の消光に起因する）蛍光の欠如によって証明される（図22参照）。陰性結果（標的核酸の不在）は、微孔質材料を洗浄したときにナノ粒子が微孔質材料の細孔を通過する（したがって、蛍光の消光が起こらない）ために、蛍光によって証明される（図22参照）。結合しなかったプローブが検出領域から洗い流されるので、バックグラウンド蛍光は低い。さらに、陽性結果の場合、蛍光の変化は温度の関数として観察され得る。例えば、温度を上昇させて行くと、デハイブリダイゼーション温度に達すると同時に蛍光が観察されるであろう。したがって、温度の関数として蛍光を見れば、オリゴヌクレオチドプローブと標的核酸との相補性度についての情報を得ることができ、蛍光は、UVランプで溶液または微孔質材料を照明するだけで生成させることができ、蛍光シグナルは肉眼でモニターし得る。代わりに、より定量的な結果を得るために、蛍光光度計を前面モードで用いて、短経路長で溶液の蛍光を測定してもよい。

【0146】

さらに別の実施態様では、「サテライトプローブ」を用いる（図24参照）。サテライトプローブは、核酸用アッセイにおける検出に用い得る1種または数種の物性（例えば、濃色、蛍光消光能、磁性）を有する中心粒子を含んでいる。適当な粒子としては、ナノ粒子や上述の他の粒子などがある。粒子には、オリゴヌクレオチド（すべて同じ配列を有する）が付着している（図24参照）。粒子にオリゴヌクレオチドを付着させる方法は上記に説明されている。オリゴヌクレオチドは、少なくとも第1部分と第2部分を含んでおり、これらの部分はどちらも標的核酸の配列の部分と相補的である（図24参照）。サテライトプローブはさらに、プローブオリゴヌクレオチドを含んでいる。各プローブオリゴヌクレオチドは、少なくとも第1部分と第2部分を有している（図24参照）。プローブオリゴヌクレオチドの第1部分の配列は、中心粒子上に固定化されているオリゴヌクレオチドの第1部分の配列と相補的である（図24参照）。その結果、中心粒子とプローブオリゴヌクレオチドとを接触させると、中心粒子上のオリゴヌクレオチドは、プローブオリゴヌクレオチドとハイブリダイズしてサテライトプローブを形成する（図24参照）。プローブオリゴヌクレオチドの第1および第2部分は共に、標的核酸の配列の部分と相補的である（図24参照）。各プローブオリゴヌクレオチドは、以下に詳細に説明するように、レポーター分子で標識されている（図24参照）。プローブオリゴヌクレオチドと標的との間のハイブリダイゼーションオーバーラップの量（ハイブリダイズしている部分の長さ）は、プローブオリゴヌクレオチドと粒子に付着しているオリゴヌクレオチドとの間のハイブリダイゼーションオーバーラップと同じかそれより大きい（図24参照）。したがって、デハイブリダイゼーションおよびリハイブリダイゼーションをもたらし温度循環により、プローブオリゴヌクレオチドの中心粒子から標的への移動が促進される。次いで、標的にハイブリダイズしたプローブオリゴヌクレオチドから粒子を分離し、レポーター分子を検出する。

【0147】

サテライトプローブは種々の検出法に用い得る。例えば、中心粒子が磁性コアを有し、かつ周囲のプローブオリゴヌクレオチドに付着している発蛍光団の蛍光を消光し得る材料で被覆されている場合、この系は、核酸用の *in situ* 蛍光光度検出計画に用い得る。官能化ポリマーコート磁性粒子 (Fe_3O_4) は、ディナル社 (Dynal) ($\text{Dynabeads}^{\text{TM}}$) およびバングス・ラボラトリーズ社 (Bangs Laboratories) ($\text{Estapor}^{\text{TM}}$) を含めたいくつかの調製業者から入手可能であり、シリカコート磁性 Fe_3O_4 ナノ粒子は、十分に開発されたシリカ表面化学 (Christy, *Nucleic Acids Research*, 第24巻, 3031-3039 ページ (1996年)) を用いて改質 (Liu, *Chem. Mater.*, 第10巻, 3936-3940 ページ (1998年))、磁性プローブとしても用い得る。さらに、染料分子、4-((4-(ジメチルアミノ)フェニル)アゾ)安息香酸 (DABCYL) は、オリゴヌクレオチドに付加された多様な発蛍光団に対して有能な蛍光消光物質であ

ることが証明されている (Tyagiら, *Nature Biotech.*, 第16巻, 49-53ページ (1998年))。市販のDABCYLスルホニルエチルエーテル (分子プローブ) は、第一級アルキルアミノ基と反応すると極めて安定なアミド結合を形成する。このように、任意の磁性粒子または第一級アルキルアミノ基でポリマーコートされた磁性粒子は、両オリゴヌクレオチドに加えてこれらの消光物質分子を用いて改質し得る。あるいは、DABCYL消光物質は、アルキルアミノ改質表面の代わりに、表面結合オリゴヌクレオチドに直接付着させてもよい。プローブオリゴヌクレオチドを含むサテライトプローブを標的と接触させる。デハイブリダイゼーションおよび再ハイブリダイゼーションを起こすように温度を循環させ、それによって、プローブオリゴヌクレオチドを中心粒子から標的に移動させる。磁場を印加、粒子を溶液から除去し、標的にハイブリダイズした溶液中に残留するプローブオリゴヌクレオチドの蛍光を測定することにより検出が達成される。

10

【0148】

この方法は、染料コーティングを有する磁性粒子と共に、磁気ナノ粒子上の染料とは異なる光学特性を有するか、または磁気ナノ粒子上の染料の光学特性を振動させる染料で標識したプローブオリゴヌクレオチドを用いて比色アッセイにも応用することができる。粒子およびプローブオリゴヌクレオチドが共に溶液中に存在する場合、この溶液は、2種の染料の組合せに由来する1つの色を呈するであろう。しかし、標的核酸の存在下に温度を循環させると、プローブオリゴヌクレオチドは、サテライトプローブから標的に移動するであろう。一旦これが起こると、磁場の印加により、標的にハイブリダイズした、単一染料で標識されたプローブオリゴヌクレオチドを残して、染料コート磁性粒子が溶液から除去される。この系は、標的レベルまたは色の濃さに応じて、比色計または肉眼で追うことができる。

20

【0149】

また、この方法は、オリゴヌクレオチド-磁性粒子共役体と共に、レドックス活性分子が付着しているプローブオリゴヌクレオチドを用いることにより、電気化学アッセイにも応用することもできる。十分に研究が進んだレドックス活性フェロセン誘導体などの任意の改質可能なレドックス活性種を用い得る。標準ホスホロアミダイト化学を用いて、フェロセン誘導体ホスホロアミダイトを直接オリゴヌクレオチドに付着させることができる。Mucicra, *Chem. Commun.*, 第555巻 (1996年); Eckstein編, *Oligonucleotides and Analogues*, 第1版, Oxford University, New York, NY (1991年)。フェロセニルホスホロアミダイトは、6-プロモヘキシルフェロセンから2段階合成法で調製する。通常の調製においては、6-プロモヘキシルフェロセンを水性HMPA溶液中120℃で6時間攪拌して、6-ヒドロキシヘキシルフェロセンを生成する。精製後、6-ヒドロキシヘキシルフェロセンをN, N-ジイソプロピルエチルアミンおよびβ-シアノエチルN, N-ジイソプロピルクロロホスホラミドのTHF溶液に加えてフェロセニルホスホロアミダイトを生成する。ポリマーが電気化学活性フェロセン分子を含有するオリゴヌクレオチド改質ポリマーコート金ナノ粒子を利用してもよい。Watsonら, *J. Am. Chem. Soc.*, 第121巻, 462-463ページ (1999年)。アミノ修飾オリゴヌクレオチドと反応させるために、このポリマーにアミノ反応性部位のコポリマー (例えば、無水物) を組み込んでよい。Mollerら, *Bioconjugate Chem.*, 第6巻, 174-178ページ (1995年)。標的の存在下に温度を循環させると、レドックス活性プローブオリゴヌクレオチドは、サテライトプローブから標的に移動するであろう。一旦これが起こると、磁場の印加により、標的核酸にハイブリダイズしたレドックス活性プローブオリゴヌクレオチドを残して、磁性粒子が溶液から除去されるであろう。次いで、レドックス活性分子を調べることができるサイクリックボルタメトリまたは任意の電気化学的技術により標的の量を定量し得る。

30

40

【0150】

本発明のさらに別の実施態様において、核酸は、核酸とオリゴヌクレオチドが付着してい

50

る基板とを接触させて検出する。オリゴヌクレオチドは、核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有している。オリゴヌクレオチドは、基板上に配置されている1対の電極間に配置されている。基板は、導電体ではない材料（例えば、ガラス、石英、ポリマー、プラスチック）製でなければならない。電極は、任意の標準材料（例えば、金、白金、酸化スズなどの金属）製であってよい。電極は、慣用のマイクロファブリケーション技術を用いて作製することができる。例えば、Introduction To Microlithography (L. F. Thompsonら編, ACS, Washington, D. C., 1983年) 参照。基板の上には、単一の核酸の多重部分、複数の異なる核酸、またはその両方を検出できるように複数の電極対をアレイ状に配置し得る。電極アレイは、（例えば、アプテック・サイエンティフィック社、バージニア州リッチモンド所在 (Abbtech Scientific, Inc., Richmond, Virginia) から購入することもできるし、慣用のマイクロファブリケーション技術を用いて作製することもできる。例えば、Introduction To Microlithography (L. F. Thompsonら編, ACS, Washington, D. C., 1983年) 参照。アレイを作製するのに適したフォトマスクは、（例えば、フォトリソクス社、カリフォルニア州ミルピタス所在 (Photronics, Milpitas, CA) から購入し得る。各アレイ電極対は、2つの電極間で基板に付着したある種類のオリゴヌクレオチドを有している。接触ステップは、基板上のオリゴヌクレオチドと核酸とをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に行う。次いで、基板に結合した核酸のある種類のナノ粒子と接触させる。ナノ粒子は導電性でなければならない。そのようなナノ粒子としては、金ナノ粒子のように金属でできたナノ粒子や、半導体材料製でできたナノ粒子が含まれる。ナノ粒子には、少なくとも1種類のオリゴヌクレオチドが核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有する、1つ以上の種類のオリゴヌクレオチドが付着しているであろう。接触ステップは、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸とをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に行う。核酸が存在する場合、電極間の回路は、ナノ粒子が基板の電極間に付着するために閉鎖するはずであり、導電率の変化が検出される。1種類のナノ粒子が結合すると、回路の開閉は起こらず、この状況は、もっと狭い電極間間隔を用いるか、もっと大きいナノ粒子を用いるか、または回路を開閉する別の材料を用いる（但し、ナノ粒子が基板の電極間に結合した場合のみ）ことにより対応し得る。例えば、金ナノ粒子を用いる場合、基板を（上述のように）銀染料と接触させて銀を電極間に堆積させることにより回路を開閉し、導電率の検出可能な変化を生成させる。1種類のナノ粒子の付加が十分ではない場合に回路を開閉させる別の方法は、基板に結合している第1種類のナノ粒子を、第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドに対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している第2種類のナノ粒子と接触させる方法である。接触ステップは、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズさせるのに有効な条件下に行う。必要または所望なら、回路の開閉に十分な数のナノ粒子が基板に付着するまで、第1および第2種類のナノ粒子を交互に加えて、追加のナノ粒子層を堆積することができる。個々のナノ粒子を堆積する別の代替法は、凝集体プローブの使用である（上記参照）。

【0151】

本発明はさらに、核酸を検出するためのキットも提供する。キットは、1つの実施態様において、少なくとも1つの容器を含み、この容器は、オリゴヌクレオチドが付着している少なくとも2種類のナノ粒子を保持している。第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有している。第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有している。容器はさらに、核酸の第3部分に対して相補的な配列を有するフィラーオリゴヌクレオチドを含むこともあり、この第3部分は、第1部分と第2部分の間に配置されている。フィラーオリゴヌクレオチドは別個の容器中に入れておいてもよい。

【0152】

第2の実施態様において、キットは少なくとも2つの容器を含む。第1容器は、核酸の第

10

20

30

40

50

1 部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を保持している。第2容器は、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を保持している。キットはさらに、核酸の第3部分に対して相補的な配列を有するフィラーオリゴヌクレオチドが入った第3容器を含むこともあり、第3部分は第1部分と第2部分の間に配置されている。

【0153】

別の代替実施態様において、キットは、別々の容器に入ったオリゴヌクレオチドとナノ粒子を有し、オリゴヌクレオチドは核酸検出アッセイの実施前にナノ粒子に付着させる必要がある。オリゴヌクレオチドおよび/またはナノ粒子は、オリゴヌクレオチドがナノ粒子に付着し得るように官能化させ得る。あるいは、オリゴヌクレオチドおよび/またはナノ粒子は、キット中に官能基を有さない状態で供給してもよいが、その場合、オリゴヌクレオチドはアッセイの実施前に官能化しなければならない。

【0154】

別の実施態様において、キットは、少なくとも1つの容器を含む。容器は、オリゴヌクレオチドが付着している金属または半導体ナノ粒子を保持している。オリゴヌクレオチドは核酸の一部に対して相補的な配列を有しており、オリゴヌクレオチドのナノ粒子には付着していない末端には蛍光分子が付着している。

【0155】

さらに別の実施態様において、キットは基板を含み、基板にはナノ粒子が付着している。ナノ粒子には、核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。キットはさらに、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子が入った第1容器を含んでいる。オリゴヌクレオチドは、同一または異なる配列を有しているが、各オリゴヌクレオチドは、核酸の一部に対して相補的な配列を有している。キットはさらに、少なくとも2つの部分を含む選択された配列を有する結合オリゴヌクレオチドが入った第2容器を含んでおり、選択配列の第1部分は、第1容器中のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部と相補的である。また、キットは、結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子が入った第3容器を含む。

【0156】

別の実施態様において、キットは、核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している基板を含んでいる。キットはさらに、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子が入った第1容器を含んでいる。オリゴヌクレオチドは、同一または異なる配列を有しているが、各オリゴヌクレオチドは核酸の一部に対して相補的な配列を有している。キットはさらに、第1容器中のナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドの少なくとも一部に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子が入った第2容器を含んでいる。

【0157】

さらに別の実施態様において、キットは、別々の容器に入った基板、オリゴヌクレオチドおよびナノ粒子を有している。基板、オリゴヌクレオチドおよびナノ粒子は、核酸検出アッセイを実施する前に互いに適切に付着させなければならない。基板、オリゴヌクレオチドおよび/またはナノ粒子は、この付着を促進するために官能化し得る。あるいは、基板、オリゴヌクレオチドおよび/またはナノ粒子は、キット中に官能基を有さない状態で提供してもよいが、その場合、アッセイ実施前に官能化しなければならない。

【0158】

さらなる実施態様において、キットは、核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している基板を含んでいる。また、キットは、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着しているリボソームが入った第1容器と、少なくとも第1種類のオリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子

10

20

30

40

50

が入った第2容器を含んでおり、第1種類のオリゴヌクレオチドのナノ粒子に付着していない末端には、ナノ粒子が疎水性相互作用によりリボソームに付着し得るように、コレステリル基が付着されている。キットは、さらに、オリゴヌクレオチドが付着している第2種類のナノ粒子が入った第3容器を含んでおり、オリゴヌクレオチドは第1種類のナノ粒子に付着している第2種類のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部に対して相補的な配列を有している。第1種類のナノ粒子に付着している第2種類のオリゴヌクレオチドは、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に対して相補的な配列を有している。

【0159】

別の実施態様において、キットは、ナノ粒子が付着している基板を含み得る。ナノ粒子には、核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。キットはさらに、凝集体ブロープが入った第1容器を含んでいる。凝集したブロープは、オリゴヌクレオチドが付着している少なくとも2種類のナノ粒子を含んでいる。凝集体ブロープのナノ粒子は、それぞれに付着しているオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果として互いに結合している。凝集体ブロープの少なくとも1種類のナノ粒子には、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。

【0160】

さらに別の実施態様において、キットは、オリゴヌクレオチドが付着している基板を含み得る。オリゴヌクレオチドは、核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有している。キットはさらに、凝集体ブロープが入った第1容器を含んでいる。凝集体ブロープは、オリゴヌクレオチドが付着している少なくとも2種類のナノ粒子を含んでいる。凝集体ブロープのナノ粒子は、それぞれに付着しているオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果として互いに結合している。凝集体ブロープの少なくとも1種類のナノ粒子には、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。

【0161】

追加実施態様において、キットは、オリゴヌクレオチドが付着している基板と、凝集体ブロープが入った第1容器とを含んでいる。凝集体ブロープは、オリゴヌクレオチドが付着している少なくとも2種類のナノ粒子を含んでいる。凝集体ブロープのナノ粒子は、それぞれに付着しているオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果として互いに結合している。凝集体ブロープの少なくとも1種類のナノ粒子には、核酸配列の第1部分に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。キットはさらに、ナノ粒子が入った第2容器を含んでいる。ナノ粒子には、少なくとも2種類のオリゴヌクレオチドが付着している。第1種類のオリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有している。第2種類のオリゴヌクレオチドは、基板に付着しているオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部に対して相補的な配列を有している。

【0162】

別の実施態様において、キットは、オリゴヌクレオチドが付着している基板を含んでいる。オリゴヌクレオチドは、核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有している。キットはさらに、オリゴヌクレオチドが付着しているリボソームが入った第1容器を含んでいる。オリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有している。キットはさらに、オリゴヌクレオチドが付着している少なくとも2種類のナノ粒子を含む凝集体ブロープが入った第2容器を含んでいる。凝集体ブロープのナノ粒子は、それぞれに付着しているオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果として互いに結合している。凝集体ブロープの少なくとも1種類のナノ粒子には、ナノ粒子に付着していない末端に疎水基が付いたオリゴヌクレオチドが付着している。

【0163】

さらなる実施態様において、キットは、オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子が入った第1容器を含み得る。キットはさらに、1つ以上の追加の容器を含んでおり、各容器

は、結合オリゴヌクレオチドを保持している。各結合オリゴヌクレオチドは、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列の少なくとも一部に対して相補的な配列を有する第1部分と、検出すべき核酸の一部の配列に対して相補的な配列を有する第2部分とを有している。結合オリゴヌクレオチドの第2部分の配列は、各配列が検出すべき核酸の配列の一部と相補的である限り異なってもよい。別の実施態様において、キットは、オリゴヌクレオチドが付着している1つの種類のナノ粒子と、1つ以上の種類の結合オリゴヌクレオチドが入った容器を含んでいる。各種類の結合オリゴヌクレオチドは、少なくとも2つの部分を含む配列を有している。第1部分は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列と相補的であり、それによって結合オリゴヌクレオチドは、容器中のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとハイブリダイズする。第2部分は、核酸の一部の配列と相補的である。

10

【0164】

別の実施態様において、キットは、2つの種類の粒子が入った1つ以上の容器を含み得る。第1種類の粒子には、核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。オリゴヌクレオチドの粒子に付着していない方の末端はエネルギー供与体で標識されている。第2種類の粒子には、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。オリゴヌクレオチドの粒子に付着していない方の末端はエネルギー受容体で標識されている。エネルギー供与体および受容体は蛍光分子であってよい。

【0165】

さらなる実施態様において、キットは、オリゴヌクレオチドが付着しているある種類のラテックスミクロスフェアが入った第1容器を含んでいる。オリゴヌクレオチドは、核酸の第1部分の配列に対して相補的な配列を有しており、蛍光分子で標識されている。キットはさらに、オリゴヌクレオチドが付着しているある種類の金ナノ粒子が入った第2容器を含んでいる。これらのオリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有している。

20

【0166】

別の実施態様において、キットは、オリゴヌクレオチドが付着している第1種類の金属または半導体ナノ粒子が入った第1容器を含んでいる。オリゴヌクレオチドは、核酸の配列の第1部分に対して相補的な配列を有し、蛍光分子で標識されている。キットはさらに、オリゴヌクレオチドが付着している第2種類の金属または半導体ナノ粒子が入った第2容器を含んでいる。これらのオリゴヌクレオチドは、核酸の第2部分の配列に対して相補的な配列を有しており、蛍光分子で標識されている。

30

【0167】

さらなる実施態様において、キットは、サテライトプローブが入った容器を含んでいる。サテライトプローブは、オリゴヌクレオチドが付着している粒子を含んでいる。オリゴヌクレオチドは第1部分と第2部分を有しており、どちらの部分も核酸の配列の一部に対して相補的な配列を有している。サテライトプローブはさらに、ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドとハイブリダイズしたプローブオリゴヌクレオチドを含んでいる。プローブオリゴヌクレオチドは第1部分と第2部分を有している。第1部分は、ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドの第1部分の配列に対して相補的な配列を有しており、両部分とも、核酸の配列の一部に対して相補的な配列を有している。また、プローブオリゴヌクレオチドの一方の末端には、レポーター分子が付着している。

40

【0168】

別の実施態様において、キットは、凝集体プローブが入った容器を含んでいる。凝集体プローブは、オリゴヌクレオチドが付着している少なくとも2種類のナノ粒子を含んでいる。凝集体プローブのナノ粒子は、それぞれに付着しているオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果として互いに結合している。凝集体プローブの少なくとも1種類のナノ粒子には、核酸の配列の一部に対して相補的な配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している。

【0169】

50

追加実施態様において、キットは、凝集体ブロープが入った容器を含み得る。凝集体ブロープは、オリゴヌクレオチドが付着している少なくとも2種類のナノ粒子を含んでいる。凝集体ブロープのナノ粒子は、それぞれに付着しているオリゴヌクレオチドの一部がハイブリダイズした結果として互いに結合している。凝集体ブロープの少なくとも1種類のナノ粒子には、ナノ粒子に付着していない方の末端に疎水基が付いたオリゴヌクレオチドが付着している。

【0170】

さらに別の実施態様において、本発明は、基板の電極間にオリゴヌクレオチドが付着された、少なくとも1対の電極が配置されている基板を含む。好ましい実施態様において、基板には、単一核酸の複数の部分の検出、複数の異なる核酸の検出またはその両方を可能にするように、複数の電極対がアレイ状に付着されている。

【0171】

キットはさらに、核酸の検出に有用な他の試薬および品目を含み得る。試薬には、PCR試薬、銀染色法用試薬、ハイブリダイゼーション試薬、緩衝剤などが含まれ得る。キットの一部として提供され得る他の品目には、TLCシリカプレートなどの（ハイブリダイゼーションを視覚化するための）固体表面、微孔質材料、シリンジ、ビベット、キューベット、容器、および（ハイブリダイゼーションおよびデハイブリダイゼーション温度を制御するための）サーモサイクラーが含まれる。キットには、ヌクレオチドまたはナノ粒子を官能化する試薬を含めてもよい。

【0172】

凝集したナノ粒子の沈殿は、選択された核酸を他の核酸から分離する手段を提供する。この分離は、核酸精製における1ステップとして用い得る。ハイブリダイゼーション条件は核酸検出に関して上述したとおりである。ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを核酸に結合させる温度が T_m （オリゴヌクレオチドの半分をその相補鎖に結合させる温度）より低い場合、凝集体を沈殿させるのに十分な時間が必要である。（例えば、 T_m により測定した）ハイブリダイゼーション温度は、塩の種類（NaClまたはMgCl₂）およびその濃度に応じて異なる。塩の組成および濃度は、核酸の不在下にコロイドの凝集を誘発させることなく都合の良い作業温度でナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと核酸とのハイブリダイゼーションを促進するように選択される。

【0173】

本発明はさらに、ナノファブリケーション法を提供する。この方法は、選択された配列を有する少なくとも1種類の連結オリゴヌクレオチドを用意するステップを含む。ナノファブリケーションに用いられる連結オリゴヌクレオチドは、任意の所望配列を含んでよく、一本鎖であっても二本鎖であってもよい。連結オリゴヌクレオチドはさらに、塩基、糖、または主鎖部分に化学修飾を含み得る。連結オリゴヌクレオチド用を選択される配列や、それらの長さおよび鎖の数は、得られるナノ材料もしくはナノ構造、またはナノ材料もしくはナノ構造の部分の剛性もしくは可撓性に寄与するであろう。単1種類の連結オリゴヌクレオチドに加えて、2つ以上の異なる種類の連結オリゴヌクレオチドを用いることも考えられる。異なる連結オリゴヌクレオチドの使用数およびそれらの長さは、得られるナノ材料およびナノ構造の形状、細孔サイズおよび他の構造的特徴に寄与するであろう。

【0174】

連結オリゴヌクレオチドの配列は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドに結合させるための第1部分と第2部分を有するであろう。連結オリゴヌクレオチドの第1、第2またはそれ以上の結合部分は、同一または異なる配列を有し得る。

【0175】

連結オリゴヌクレオチドの結合部分がすべて同じ配列を有している場合、ナノ材料またはナノ構造の形成には、相補的配列を有するオリゴヌクレオチドが付着している単1種類のナノ粒子だけしか使わなくてよい。連結オリゴヌクレオチドの2つ以上の結合部分が異なる配列を有している場合、2つ以上のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を使わなければならない。例えば、図17参照。各ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、連結オリゴ

10

20

30

40

50

クレオチドの配列の2つ以上の結合部分の1つに対して相補的な配列を有しているであろう。結合部分の数、配列および長さ、もしあれば、それらの間の間隔は、得られるナノ材料およびナノ構造の構造特性および物性に寄与するであろう。連結オリゴヌクレオチドが2つの以上の部分を含む場合、結合部分の配列は、結合ヌクレオチドの1つの部分を別の部分に結合するのを回避するために互いに対して相補的でないように選択する必要がある。

【0176】

連結オリゴヌクレオチドとナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を、ナノ粒子がオリゴヌクレオチドコネクタを介して纏まっている所望のナノ材料またはナノ構造が形成されるように、ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドと連結オリゴヌクレオチドとをハイブリダイズさせるのに有効な条件下に接触させる。これらのハイブリダイゼーション条件は、当該技術分野では周知であり、特定のナノファブリケーション計画に合わせて最適化し得る(上記参照)。ストリンジェントなハイブリダイゼーション条件が好ましい。

【0177】

さらに本発明は別のナノファブリケーション法を提供する。この方法は、少なくとも2種類のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を与えるステップを含む。第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に対して相補的な配列を有している。第2種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、第1種類のナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの配列に対して相補的な配列を有している。ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を、ナノ粒子がオリゴヌクレオチドコネクタを介して纏まっている所望のナノ材料またはナノ構造が形成されるように、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドを互いにハイブリダイズさせるのに有効な条件下に接触させる。この場合も、これらのハイブリダイゼーション条件は、当該技術分野では周知であり、特定のナノファブリケーション計画に合わせて最適化し得る。

【0178】

本発明のどちらのナノファブリケーション法においても、1つ以上の異なる種類のオリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子の使用が想定される。ナノ粒子に付着している異なるオリゴヌクレオチドの数や、1つ以上のオリゴヌクレオチドの長さおよび配列は、得られるナノ材料およびナノ構造の剛性および構造特徴に寄与するであろう。

【0179】

また、ナノ粒子のサイズ、形状および化学組成も、得られるナノ材料およびナノ構造の特性に寄与するであろう。これらの特性には、光学特性、光電子特性、電気化学特性、電子特性、種々の溶媒中での安定性、細孔およびチャンネルサイズの変化、フィルターとしての役割を果たす間の生物活性分子の分離能などが含まれる。異なるサイズ、形状および/または化学組成を有するナノ粒子混合物の使用に加えて、均一なサイズ、形状および化学組成を有するナノ粒子の使用も想定される。

【0180】

いずれのファブリケーション法においても、得られるナノ材料またはナノ構造中のナノ粒子は、オリゴヌクレオチドコネクタを介して結合する。オリゴヌクレオチドコネクタの配列、長さおよび鎖の数や、存在する異なるオリゴヌクレオチドコネクタの数は、ナノ材料またはナノ構造の剛性および構造特性に寄与するであろう。オリゴヌクレオチドコネクタが部分的に二本鎖である場合、その剛性は、核酸検出法に関連して上述したフィラーオリゴヌクレオチドを用いることによって増強し得る。完全二本鎖オリゴヌクレオチドコネクタの剛性は、完全二本鎖オリゴヌクレオチドコネクタに結合して三本鎖オリゴヌクレオチドを形成するように相補的な配列を有する1つ以上の強化オリゴヌクレオチドを用いて増強し得る。デオキシクアノシン(deoxyquanosine)またはデオキシシチジン四重鎖をベースとする四本鎖オリゴヌクレオチドコネクタの使用も想定される。

【0181】

オリゴヌクレオチドハイブリダイゼーションに基づいてナノ粒子を組織化するための様々な系のいくつかを図面に示されている。単純な系(図1)では、一方のナノ粒子セットは

10

20

30

40

50

規定配列を有するオリゴヌクレオチドを有し、別のナノ粒子セットはそれに相補的配列を有するオリゴヌクレオチドを有している。2種のナノ粒子-オリゴヌクレオチドセットをハイブリダイゼーション条件下に混合すると、2つの種類のナノ粒子が、ナノ粒子を選択された間隔で配置するスパーサーとしての働きをする二本鎖オリゴヌクレオチドコネクタを介して結合する。

【0182】

ナノ粒子を間隔を置いて配置するための魅力的な系は、図2に示されているような1つの自由連結オリゴヌクレオチドの添加を伴う。この連結オリゴヌクレオチドの配列は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドに結合させるための少なくとも第1部分と第2部分を有するであろう。この系は、基本的には核酸検出法に利用されるものと同じであるが、但し、添加される連結オリゴヌクレオチドの長さは、ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドを合わせた長さに等しくなるように選択し得る。図3に示されている関連系は、用いられるナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体セットを変更する必要なく、ナノ粒子間の間隔を要求通りに調節する便利な手段を提供する。

【0183】

ナノ粒子間に規定間隔を創出するためのさらに精巧な計画が図4に示されている。この場合、オーバーハング末端を含むDNAまたはRNAの二本鎖セグメントが連結オリゴヌクレオチドとして用いられている。連結オリゴヌクレオチドの一本鎖オーバーハングセグメントとナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより、ナノ粒子間に多重二本鎖オリゴヌクレオチド架橋が得られる。

【0184】

より剛性のナノ材料およびナノ構造またはその部分は、ナノ粒子間に三本鎖オリゴヌクレオチドコネクタを用いることによって調製し得る。三本鎖を生成させる際には、ピリミジン：プリン：ピリミジンモチーフ (Moser, H. E. および Dervan, P. B., Science, 第238巻, 645-650ページ (1987)) またはプリン：プリン：ピリミジンモチーフ (Pilch, D. S. 他, Biochemistry, 第30巻, 6081-6087ページ (1991年)) のいずれかを利用し得る。ピリミジン：プリン：ピリミジンモチーフを用いた三本鎖コネクタの調製によるナノ粒子組織化の1つの例が図10に示されている。図10に示されている系において、1つのナノ粒子セットをピリミジンヌクレオチドを含む規定鎖と結合させ、他のセットをプリンヌクレオチドを含む相補的オリゴヌクレオチドと結合させる。オリゴヌクレオチドの付着は、ナノ粒子がハイブリダイゼーション時に形成された二本鎖オリゴヌクレオチドによって分離されるように設計する。次いで、この系に、ナノ粒子を混合する前、混合と同時に、または混合直後に、ナノ粒子に結合しているピリミジン鎖の配向と反対配向の自由ピリミジンオリゴヌクレオチドを加える。この系中の第3の鎖は、フーグスティーン型塩基対を介して保持されているので、三本鎖は比較的熱に不安定である。二本鎖の幅にわたる共有結合架橋は三本鎖複合体を安定化することが知られている (Salunke, M., Wu, T., Letsinger, R. L., J. Am. Chem. Soc., 第114巻, 8768-8772ページ (1992年); Letsinger, R. L. および Wu, T., J. Am. Chem. Soc., 第117巻, 7323-7328ページ (1995年); Prakash, G. および Kool, J. Am. Chem. Soc., 第114巻, 3523-3527ページ (1992年))。

【0185】

ナノ材料およびナノ構造を構築するためには、オリゴヌクレオチド成分のハイブリダイゼーションによるナノ材料またはナノ構造の形成後に、集合体を共有結合架橋により適切な場所で「ロック」するのが望ましい場合がある。これは、オリゴヌクレオチドに、不可逆反応を始動させる官能基を組み込むことによって達成し得る。このための官能基の1つの例は、スチルベンジカルボン酸基である。ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド内で整列している2つのスチルベンジカルボキサミド基に紫外光 (340nm) を照射すると容易に架橋が達成されることが証明された (Lewis, F. D., J. Am. Chem

10

20

30

40

50

. Soc., 第117巻, 8785-8792ページ(1995年))。

【0186】

代わりに、メルカプトアルキル基を介してナノ粒子の3'位に保持されているオリゴヌクレオチドの5'-O-トリシル基を、メルカプトアルキル基を介してナノ粒子に保持されているオリゴヌクレオチドの3'末端のチオホスホリル基で、置換する方法を用いてもよい。両オリゴヌクレオチドにハイブリダイズし、それによってチオホスホリル基をトリシル基に近接させるオリゴヌクレオチドの存在下では、トリシル基はチオホスホリル基で置換され、両末端が2つの異なるナノ粒子に結合したオリゴヌクレオチドが生成する。この種類の置換反応に関しては、Herrleinら, J. Am. Chem. Soc., 第177巻, 10151-10152ページ(1995年)を参照されたい。チオホスホリルオリゴヌクレオチドが、メルカプトアルキル-オリゴヌクレオチドの金ナノ粒子への付着に用いられる条件下では金ナノ粒子と反応しないという事実から、メルカプト基を介してナノ粒子に結合し、カップリング反応に利用できる末端チオホスホリル基を含む金ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体の調製が可能になる。

【0187】

集合したナノ粒子系を適切な場所でロックするための関連カップリング反応は、GryaznovおよびLetsinger, J. Am. Chem. Soc., 第115巻, 3808ページに記載のように、末端プロモアセチルアミノヌクレオシドのプロミドの末端チオホスホリル-オリゴヌクレオチドによる置換を利用する。この反応は、上述のトリシラートの置換と同じように進行するが、反応速度がもっと速い。チオホスホリル基を末端基とするオリゴヌクレオチドを担持するナノ粒子は上述のように調製する。プロモアセチルアミノ基を末端基とするオリゴヌクレオチドを担持するナノ粒子を調製するためには、先ず、一方の末端がアミノヌクレオシド(例えば、5'-アミノ-5'-デオキシチミジンまたは3'-アミノ-3'-デオキシチミジン)を末端基とし、他方の末端がメルカプトアルキル基を末端基とするオリゴヌクレオチドを作製する。次いで、このオリゴヌクレオチド分子をメルカプト基を介してナノ粒子に固定し、次いで、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体をプロモアセチルアルシル化剤と反応させてN-プロモアセチルアミノ誘導体に転化させる。

【0188】

集合体を適切な場所でロックするための第4のカップリング計画は、チオホスホリル基を末端基とするオリゴヌクレオチドを担持するナノ粒子の酸化を利用する。三ヨウ化カリウム、フェリシアン化カリウム(GryaznovおよびLetsinger, Nucleic Acids Research, 第21巻, 1403ページ)または酸素などの穏和な酸化剤が好ましい。

【0189】

さらに、ナノ材料およびナノ構造の特性は、連続オリゴヌクレオチド鎖に、オリゴヌクレオチド鎖に共有結合付加されて適切な場所に保持された有機および無機官能基を組み込むことにより変性させ得る。多様な主鎖、塩基および糖修飾が周知である(例えば、Uhlmann, E. およびPeyman, A., Chemical Reviews, 第90巻, 544-584ページ(1990年)参照)。また、オリゴヌクレオチド鎖は、ヌクレオチド塩基がポリペプチド主鎖によって保持されている「ペプチド核酸」鎖(PNA)で置換し得る(Wittung, P. 5, Nature, 第367巻, 561-563ページ(1994年)参照)。

【0190】

上記から分るように、本発明のナノファブ리케이션法は極めて用途が広い。連結オリゴヌクレオチドの長さ、配列および鎖の数や、ナノ粒子に付着させるオリゴヌクレオチドの長さ、配列および数、ナノ粒子のサイズ、形状および化学組成、用いられる異なる連結オリゴヌクレオチドおよびナノ粒子の数および種類、オリゴヌクレオチドコネクタの鎖の数を要することにより、多岐にわたる構造および特性を有するナノ材料およびナノ構造を調製することができる。これらの構造および特性は、オリゴヌクレオチドコネクタを架橋

10

20

30

40

50

したり、オリゴヌクレオチドを官能化したり、オリゴヌクレオチドの主鎖、塩基または糖を修飾したり、またはペプチド核酸を用いたりしてさらに変えることができる。

【0191】

本発明のナノファブリケーション法によって調製し得るナノ材料およびナノ構造には、ナノスケール機械装置、分離膜、バイオフィルターおよびバイオチップなどがある。本発明のナノ材料およびナノ構造は、化学センサーとして、コンピュータに、薬剤送用に、タンパク質工學用に、また、生合成／ナノ構造ファブリケーション／他の構造の指定集合体の鋳型として、使用可能であると想定される。他の可能な用途に関しては、一般に、*See* *man* *an*, *New J. Chem.*, 第17巻, 739ページ(1993年)を参照されたい。本発明のナノファブリケーション法によって調製し得るナノ材料およびナノ構造としてはさらに電子デバイスを挙げるができる。核酸が電子を移動させるかどうかについてはかなり議論されてきた。以下の実施例21に示されているように、DNAを介して集合したナノ粒子は電気を伝導する(DNAコネクタは半導体として機能する)。

【0192】

最後に、本発明は、いくつかの独特なナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体調製法を提供する。最初のそのような方法において、オリゴヌクレオチドを荷電ナノ粒子に結合させて安定なナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成する。荷電ナノ粒子には、金ナノ粒子などの金属膜ナノ粒子が含まれる。

【0193】

上記方法は、ナノ粒子に結合し得る官能基を含む部分が共有結合しているオリゴヌクレオチドを用意するステップを含む。そのような部分と官能基は、オリゴヌクレオチドとナノ粒子との結合(すなわち、化学吸着または共有結合)に関して上述したものである。例えば、5'または3'末端にアルカンチオール、アルカンジスルフィド、または環式ジスルフィドが共有結合しているオリゴヌクレオチドを、金ナノ粒子を含めた種々のナノ粒子に結合させることができる。

【0194】

水中でオリゴヌクレオチドとナノ粒子とを、少なくとも一部のオリゴヌクレオチドを官能基を介してナノ粒子に結合させるのに十分な時間接触させる。そのような時間は経験的に決定し得る。例えば、約12〜24時間で良好な結果が得られることが判明した。他の適当なオリゴヌクレオチド結合条件も経験的に決定し得る。例えば、約12〜20 nMのナノ粒子濃度および室温下のインキュベーションによって良好な結果が得られる。

【0195】

次いで、少なくとも1種の塩を水に添加して塩溶液をつくる。塩は任意の水溶性塩であってよい。例えば、塩は、塩化ナトリウム、塩化マグネシウム、塩化カリウム、塩化アンモニウム、酢酸ナトリウム、酢酸アンモニウム、2種以上のこれらの塩の組合せ、またはリン酸緩衝液中のこれらの塩の1種であってよい。塩は、濃縮溶液として添加するのが好ましいが、固体として添加してもよい。塩は、水に一度に添加してもよいし、経時的に漸進的に添加してもよい。「経時的に漸進的に」とは、塩を少なくとも2つの部分に分けて一定の時間間隔を置いて添加することを意味する。適当な時間間隔は経験的に決定し得る。

【0196】

塩溶液のイオン強度は、オリゴヌクレオチドの互いからの静電斥力と、正に帯電したナノ粒子に対する負に帯電したオリゴヌクレオチドの静電引力、または負に帯電したナノ粒子からの負に帯電したオリゴヌクレオチドの静電斥力とを少なくとも部分的に克服するのに十分でなければならない。経時的に漸進的に塩を添加することにより静電引力および静電斥力を漸進的に減少させると、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの表面密度が最も高くなることが判明した。各塩または塩の組合せに適したイオン強度は経験的に決定し得る。塩化ナトリウムの濃度は経時的に漸進的に増大させるのが好ましく、リン酸緩衝液中約0.1 M〜約1.0 Mの塩化ナトリウム最終濃度が良好な結果を生じることが判明した。

【0197】

塩を添加した後、塩溶液中で、オリゴヌクレオチドとナノ粒子を、追加のオリゴヌクレオ

10

20

30

40

50

チドをナノ粒子に結合させて安定なナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を生成するのに十分な追加時間インキュベートする。以下に詳細に説明するように、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの表面密度が増加すると、共役体が安定化することが判明した。このインキュベーションの時間は経験的に決定し得る。合計約24~48(好ましくは40時間)のインキュベーション時間で良好な結果が得られることが分った(これは、合計インキュベーション時間である。上述のように、塩濃度は、この合計時間にわたって漸進的に増大させる得る)。塩溶液中でのこの第2インキュベーション時間は、本明細書では「熟成」ステップと称する。この「熟成」ステップに適した他の条件は経験的に決定し得る。例えば、室温下のインキュベーションおよびpH7.0で良好な結果が得られる。

【0198】

「熟成」ステップを用いて生成した共役体は、「熟成」ステップを用いずに生成したものよりかなり安定度が高いことが分った。上述のように、この安定性の向上は、「熟成」ステップによって達成されるナノ粒子表面上のオリゴヌクレオチド密度の増加によるものである。「熟成」ステップにより達成される表面密度は、ナノ粒子のサイズおよび種類、ならびにオリゴヌクレオチドの長さ、配列および濃度に依存するであろう。ナノ粒子を安定化するのに適した表面密度および所望のナノ粒子とオリゴヌクレオチドの組合せを得るのに必要な条件は、経験的に決定し得る。一般に、安定なナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を得るためには、少なくとも 10 pmol/cm^2 の表面密度が適当であろう。表面密度は少なくとも 15 pmol/cm^2 が好ましい。共役体のオリゴヌクレオチドが核酸およびオリゴヌクレオチド標的とハイブリダイズする能力は表面密度が高すぎると低下するので、表面密度は約 $35 \sim 40 \text{ pmol/cm}^2$ 以下が好ましい。

【0199】

本明細書に使用する場合、「安定な」とは、共役体生成後少なくとも6ヶ月間に、大多数のオリゴヌクレオチドがナノ粒子に付着したままであり、オリゴヌクレオチドが、核酸検出法およびナノファブリケーション法において遭遇する標準条件下に核酸およびオリゴヌクレオチド標的とハイブリダイズし得ることを意味する。

【0200】

この方法で調製されたナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体は、それらの安定性の他に、他の優れた特性を示す。例えば、本願の実施例5、7および19を参照されたい。特に、共役体の表面密度が高いため、共役体は、標的核酸またはオリゴヌクレオチドの存在下では、大きな凝集体として集合するであろう。凝集体が生成し、解離する温度範囲は予想外に極めて狭いことが判明したが、この固有の特徴は、重要な実用的成果をもたらす。特に、これは、本発明の検出法の選択性および感度を高める。この共役体を用いて、1塩基誤対合および 20 fmol 程度の小さい標的を検出することができる。これらの特徴はもともと溶液中で実施したアッセイで発見されたものであるが、これらの共役体を用いることの利点は、1種類のみの共役体しか使用しないアッセイを含めた、基板上で実施するアッセイにも及ぶことが判明した。

【0201】

ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体のハイブリダイゼーション効率を、認識部分とスベーパー部分を含む認識オリゴヌクレオチドの使用によって劇的に増加させることができることがわかっていいる。「認識オリゴヌクレオチド」とは、核酸またはオリゴヌクレオチド標的の配列の少なくとも一部分に相補的な配列を含むオリゴヌクレオチドである。この実施形態では、認識オリゴヌクレオチドは認識部分およびスベーパー部分を含み、認識部分が核酸またはオリゴヌクレオチド標的にハイブリダイズする。認識オリゴヌクレオチドのスベーパー部分は、該スベーパー部分がナノ粒子に結合できるように設計される。例えば、スベーパー部分には、ナノ粒子に結合可能な官能基を含む部分が、共有結合によって結び付けられる。これらは上述したのと同じ部分および官能基である。ナノ粒子に対して認識オリゴヌクレオチドのスベーパー部分が結合した結果、認識部分はナノ粒子の表面から遠ざかり、その標的とのハイブリダイゼーションのためによりアクセス可能となる。認識部分のナノ粒子からのよい離間性を提供するスベーパー部分の長さや配列は、経験的に決

10

20

30

40

50

定することが可能である。少なくとも約10ヌクレオチド、好ましくは10～30ヌクレオチドを含むスパーサー部分が、好結果を与えることがわかった。スパーサー部分は、認識オリゴヌクレオチドの、ナノ粒子への結合能もしくは核酸またはオリゴヌクレオチド標的への結合能に干渉しない、任意の配列を有してよい。例えば、スパーサー部分は、認識オリゴヌクレオチドの配列や認識オリゴヌクレオチドの核酸またはオリゴヌクレオチド標的の配列に対し、互い相補的な配列を有するべきではない。好ましくは、スパーサー部分のヌクレオチドの塩基は、すべてアデニン、すべてのチミン、すべてシチジン、またはすべてグアニンであり、そうでなければ上述のような問題が起こる可能性がある。より好ましくは、塩基はすべてアデニンまたはすべてのチミンである。好ましくは、塩基はすべてチミンである。

【0202】

所望のレベルのハイブリダイゼーションを与えるために、認識オリゴヌクレオチドに加える希釈剤オリゴヌクレオチドの使用が、共役体を要求に合わせて作製する(あつらえる)手段を提供することがさらに知られている。希釈剤オリゴヌクレオチドと認識オリゴヌクレオチドは、共役体を調製するためにナノ粒子に接触させた時の溶液中の比とほぼ同じ比率でナノ粒子に付くことが分かった。したがって、共役体が所望の数のハイブリダイゼーション事象に参与するように、ナノ粒子に結び付けられた希釈剤オリゴヌクレオチド対認識オリゴヌクレオチドの比を制御することができる。希釈剤オリゴヌクレオチドは、認識オリゴヌクレオチドの、ナノ粒子への結合能もしくは核酸またはオリゴヌクレオチド標的への結合能に干渉しない、任意の配列を有してよい。例えば、希釈剤オリゴヌクレオチドは、認識オリゴヌクレオチドの配列や認識オリゴヌクレオチドの核酸またはオリゴヌクレオチド標的の配列に対し、互い相補的な配列を有するべきではない。希釈剤オリゴヌクレオチドは、認識オリゴヌクレオチドがその核酸またはオリゴヌクレオチド標的に結合できるように、認識オリゴヌクレオチドよりも短い長さを好ましくは有する。認識オリゴヌクレオチドがスパーサー部分を含む場合、希釈剤オリゴヌクレオチドは、最も好ましくはスパーサー部分とほぼ同じ長さである。このように、希釈剤オリゴヌクレオチドは、認識オリゴヌクレオチドの認識部分の核酸またはオリゴヌクレオチド標的のハイブリダイズする能力に干渉しない。さらに好ましくは、希釈剤オリゴヌクレオチドは、認識オリゴヌクレオチドのスパーサー部分の配列と同じ配列を有する。

【0203】

容易に理解できるように、非常に望ましいナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を、上述のすべての方法を用いて調製することができる。そうすることによって、要求に合わせたハイブリダイゼーション能力を有する安定した共役体を作製することが可能である。

【0204】

上記の共役体の任意のものは、上述の核酸検出方法のいずれに使用してもよいし、好ましくは使用される。また、本発明は、上記共役体のうちの任意のものを入れた容器を含むキットも提供する。その上、該共役体は、本発明のナノファブリケーションの方法ならびに核酸分離方法のいずれに使用してもよいし、好ましくは使用される。

【0205】

用語「ある」存在とは、「1つ以上の」その存在を表す。例えば、「ある特徴」とは、1つ以上の特徴または少なくとも1つの特徴を表す。したがって、本明細書においては、用語「ある」「1つ以上」および「少なくとも1つ」は互換的に用いられる。用語「含んで」は「含む」および「有する」は互換的に用いられていることに留意されたい。

【0206】

(実施例)

実施例1: オリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子

A: 金ナノ粒子の調製

Frens, Nature Phys. Sci., 第241巻, 20ページ(1973年)およびGrabar, Anal. Chem., 第67巻, 735ページ(1995年)に記載のように、HAuCl₄をクエン酸塩で還元して、金コロイド(直径13nm)を

10

20

30

40

50

調製した。簡単に説明すると、すべてのガラス器を王水（3部の HCl 、1部の HNO_3 ）で洗浄し、Nanopure H_2O でリンス、次いで使用前にオーブンで乾燥させた。 HAuCl_4 およびクエン酸ナトリウムはオールドリッチケミカル社（Aldrich Chemical Company）から購入した。水性 HAuCl_4 （1mM、500ml）を攪拌還流させた。次いで、38.8mMのクエン酸ナトリウム（50ml）を素早く添加した。溶液の色は薄黄色から暗紅色に変わったが、還流を15分間継続した。室温に冷ました後、赤色溶液をミクロン・セパレーションズ社（Micron Separations Inc.）の1ミクロンフィルターを通して濾過した。 Au コロイドを、Hewlett Packard 8452Aダイオードアレイ分光光度計を用いたUV-可視分光法および日立 8100透過型電子顕微鏡を用いた透過型電子顕微鏡検査（TEM）により特性決定した。直径13nmの金粒子は、標的および10～35ヌクレオチド範囲のプロブオリゴヌクレオチドと共に凝集させると目に見える変色を生じる。

【0207】

B. オリゴヌクレオチドの合成

ホスホロアミダイト化学を用いる単カラムモードのMilligene Expedite DNA合成機を用いて1 μmol スケールでオリゴヌクレオチドを合成した。Eckstein, F. (編), *Oligonucleotides and Analogues: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991年)。すべての溶液はミリジーン社（Milligene）（DNA合成グレード）から購入した。平均カップリング効率は98～99.8%の範囲であり、最終ジメトキシトリチル（DMT）保護基は精製を支援するためにオリゴヌクレオチドから切断しなかった。

【0208】

3'-チオールオリゴヌクレオチドを得るために、チオール修飾剤C3-S-S-CPG支持体をグレン・リサーチ社（Glen Research）から購入し、自動合成機に使用した。固相支持体からの通常の切断の間（55℃で16時間）に、 NH_4OH 溶液に0.05Mジチオトレイトール（DTT）を加えて、3'ジスルフィドをチオールに還元した。逆相高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で精製する前に、過剰なDTTを酢酸エチルで抽出して除去した。

【0209】

5'-チオールオリゴヌクレオチドを得るために、5'-チオール修飾剤C₆-ホスホロアミダイト試薬をヴァージニア州 20166、スターリング、ファルコン・プレイス 44901所在のグレン・リサーチ社（Glen Research, 44901 Falcon Place, Sterling, Va 20166）から購入した。オリゴヌクレオチドを合成し、最終DMT保護を除去した。次いで、100 μmol の5'-チオール変性剤C₆-ホスホロアミダイトに、1mlの無水アセトニトリルを加えた。200 μl のアミダイト溶液と200 μl の（合成機から出来たばかりの）アクチベーターとを混合し、まだ固相支持体上の合成オリゴヌクレオチドを含有するカラム上にシリンジで導入し、カラム中で10分間往復運動させた。次いで、支持体を無水アセトニトリルで30秒間洗浄（2 \times 1ml）した。カラムに700 μl の0.016M $\text{I}_2/\text{H}_2\text{O}$ /ピリジン混合物（酸化剤溶液）を導入し、次いで、2つのシリンジを用いてカラム中で30秒間往復運動させた。次いで、支持体を CH_3CN /ピリジンの1:1混合物（2 \times 1ml）で1分間洗浄した後、無水アセトニトリル（2 \times 1ml）で最終洗浄し、その後、カラムを望流で乾燥させた。精製を支援するために、トリチル保護基は除去しなかった。

【0210】

0.03M $\text{Et}_3\text{NH}^+\text{OAc}^-$ 緩衝液（TEAA）、pH7と共に、1%／分勾配の95% CH_3CN ／5%TEAAを用いて、Hewlett Packard ODSハイパーシル（hypersil）カラム（4.6 \times 200mm、5mm粒度）を具備したDionex DX500システムで、逆相HPLCを実施した。流速は1ml／分、UV検出は260nmであった。DMT保護非修飾オリゴヌクレオチドの精製には、分取

10

20

30

40

50

HPLC (溶離時間 2.7 分) を用いた。緩衝液を回収して蒸発させた後、8.0% 酢酸で室温下に 3.0 分間処理してオリゴヌクレオチドから DMT を切断した。次いで、溶液を蒸発させてほぼ乾固し、水を加え、酢酸エチルを用いて切断 DMT をオリゴヌクレオチド水溶液から抽出した。オリゴヌクレオチドの量は、260 nm での吸光度により定量し、最終純度を逆相 HPLC (溶離時間 1.4、5 分) で評価した。

【0211】

3'-チオールオリゴヌクレオチドの精製には同じプロトコルを用いたが、但し、形成されるジスルフィドの量を減少させるために DMT を抽出した後で DTT を加えた。4℃ 下に 5 時間後、酢酸エチルを用いて DTT を抽出し、オリゴヌクレオチドを HPLC (溶離時間 1.5 分) で再精製した。

【0212】

5'-チオール修飾オリゴヌクレオチドを精製するために、非修飾オリゴヌクレオチドの場合と同じ条件下に分取 HPLC を実施した。精製後、無水オリゴヌクレオチド試料に、150 μl の 50 mM AgNO₃ 溶液を加えて、トリチル保護基を除去した。試料は、切断が起こると同時に乳白色に変わった。20 分後、DTT の 10 mg/ml 溶液 200 μl を加えて Ag を複合体化 (反応時間 5 分) し、試料を遠心して黄色複合体を沈殿させた。次いで、オリゴヌクレオチド溶液 (<50 OD) を、(10 塩基を超えるオリゴヌクレオチドの脱塩および緩衝液交換用の DNA Grade Sephadex D-25 Medium を有する) 精製用の脱塩 NAP-5 カラム (スウェーデンのウプサラ所在ファルマシア・バイオテク社 (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)) 上に移した。5'-チオール修飾オリゴヌクレオチドの量を、UV-可視分光法により 260 nm での吸光度を測定して定量した。10 mM NaOH 溶液 (pH 12) と共に、2%/分勾配の 10 mM NaOH、1 M NaCl 溶液を用いて、Dionex Nucleopac PA-100 (4×250) カラムでイオン交換 HPLC を実施して、最終純度を評価した。典型的には、約 19 分および 25 分の溶離時間で 2 つのピークを得た (溶離時間はオリゴヌクレオチド鎖長に依存する)。これらのピークはそれぞれチオールオリゴヌクレオチドおよびジスルフィドオリゴヌクレオチドに対応していた。

【0213】

C. オリゴヌクレオチドの金ナノ粒子への付着

上記パート A に記載のように調製した 17 nM (150 μl) Au コロイドの水溶液を、パート B に記載のように調製した 3.75 μM (46 μl) 3'-チオール-TTTGCTGA と混合し、キャップをした 1 ml 容量 Eppendorf バイアル中室温下に 2.4 時間放置した。第 2 コロイド溶液を 3.75 μM (46 μl) 3'-チオール-TACCGTTG と反応させた。これらのオリゴヌクレオチドは非相補的であることに留意されたい。使用直前に、等量の 2 種のナノ粒子溶液を混合した。オリゴヌクレオチドは非相補的であるから、反応は起こらなかった。

【0214】

オリゴヌクレオチド修飾ナノ粒子は高温 (80℃) および高塩濃度 (1 M NaCl) 下に何日も安定であり、粒子の成長は認められなかった。高塩濃度下に安定であることは、そのような条件が本発明の検出法およびナノファブリケーションの基礎を構成するハイブリダイゼーション反応に要求されるために重要である。

【0215】

実施例 2: ナノ粒子凝集体の形成

A. 連結オリゴヌクレオチドの作製

実施例 1 のパート B に記載のように、2 種 (非チオール化) オリゴヌクレオチドを合成した。これらのオリゴヌクレオチドは以下の配列を有していた:

3' ATATGCGCGA TCTCAGCAAA (配列番号 1); および

3' GATCGCGCAT ATCAACGGTA (配列番号 2)。

これら 2 種のオリゴヌクレオチドを 1 M NaCl、10 mM リン酸緩衝 (pH 7.0

10

20

30

40

50

）溶液中で混合すると、ハイブリダイズして、12塩基対オーバーラップおよび2つの8塩基対付着末端を有する二本鎖が形成された。付着末端はそれぞれ、実施例1のパートCで調製したAuコロイドに付着しているオリゴヌクレオチドの1つの配列に対して相補的な配列を有していた。

【0216】

B. ナノ粒子凝集体の形成

この実施例のパートAで作製した連結オリゴヌクレオチド(NaClで希釈後の最終濃度0.17 μ M)を、室温下に、実施例1のパートCで調製したナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体(NaClで希釈後の最終濃度5.1nM)に加えた。次いで、溶液をNaCl水溶液で(1Mの最終濃度)に希釈し、オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションに適した条件である10mMリン酸、pH7で緩衝した。その直後に赤から紫への変色が観察され、続いて沈殿反応が生じた。図6参照。数時間の間に、溶液は透明になり、反応容器の底にピンクがかった灰色の沈殿物が沈殿した。図6参照。

【0217】

このプロセスがオリゴヌクレオチドとコロイドを共に含むことを確認するために、沈殿物を回収し、pH7で緩衝する1M NaCl水溶液中で(振とうして)再懸濁させた。このようにして、ナノ粒子にハイブリダイズしなかったオリゴヌクレオチドを除去する。次いで、ハイブリダイズしたオリゴデオキシリボヌクレオチドに特徴的な吸光度(260nm)および金粒子間の間隔を表す凝集コロイドに特徴的な吸光度(700nm)をモニターして、温度/時間分離実験を行った。図7参照。

【0218】

温度を0~80℃の間で1℃/分の速度で循環させながら、Peltier PTP-1 Temperature Controlled Cell Holderを用いるPerkin-Elmer Lambda 2UV-可視分光光度計で260および700nmでの吸光度の変化を記録した。10mMリン酸緩衝液を用いてpH7で緩衝し、1M NaCl濃度のDNA溶液は、約1吸光度単位(OD)であった。

【0219】

その結果は図8Aに示されている。温度を0℃~(二本鎖の解離温度(T_m))(T_m =42℃)より38℃高い80℃の間で循環させると、コロイドとオリゴヌクレオチドの両方の光学的シグナチャーの間に良好な相関が存在した。何も結合していないAuコロイドのUV-可視スペクトルははるかに温度依存度が低かった(図8B)。

【0220】

ポリマーオリゴヌクレオチド-コロイド沈殿物をその融解点より高い温度で加熱すると、肉眼で見える実質的な光学的变化があった。透明溶液は、ポリマー生体材料がデハイブリダイズして水溶液に可溶である非結合コロイドを生成すると、暗紅色に変わった。図8Aの温度トレースにより証明されるように、このプロセスは可逆的であった。

【0221】

対照実験において、14-T:14-A二本鎖は、可逆的Auコロイド粒子の凝集を誘発するには有効でないことが明らかにされた。別の対照実験で、付着末端に4塩基対誤対合がある連結オリゴヌクレオチド二本鎖は、(実施例1のC部に記載のように調製し、上記のように反応させた)オリゴヌクレオチド修飾ナノ粒子の可逆的粒子凝集を誘発しないことが判明した。第3の対照実験において、連結オリゴヌクレオチドの付着末端に対して相補的な配列を有し、ナノ粒子と反応させた非チオール化オリゴヌクレオチドは、ナノ粒子を連結オリゴヌクレオチドと合わせたときに可逆凝集を生成しなかった。

【0222】

重合/集合体プロセスについてのさらなる事実が沈殿物の透過型電子顕微鏡検査(TEM)研究から明らかになった。TEMは、日立8100透過型電子顕微鏡で実施した。孔の多い炭素格子上に100 μ mのコロイド溶液をスポット

【0223】

して典型的な試料を調製した。次いで、格子を真空乾燥させ、画像を形成した。ハイブリ

ダイズしたオリゴヌクレオチドを介して結合したAuコロイドのTEM画像は、集合した大きなAuコロイド網目構造を示した(図9A)。何も結合していないAuコロイドは、同等な条件下には凝集せずに、分散するか、または粒子成長反応を起こす。Hayat, Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications (Academic Press, San Diego, 1991年)。今日までに実施された実験ではコロイド粒子の成長の事実は全く存在しないことに留意されたい；ハイブリダイズしたコロイドは、平均直径が13nmの著しく一定したサイズを有するようである。

【0224】

TEMにより、三次元凝集体の秩序度の評価を困難にする層の重ね合わせが得られる。しかし、単層の二次元凝集体のもっと小規模の画像から、自己集合体プロセスに関する多くの事実が得られた(図9B)。均一な粒子が約60Å離れている密凝集体集合体が見られる。この間隔は、用いられた配列を有する剛性オリゴヌクレオチドハイブリッドを介して結合したコロイドに関して予測された95Å間隔よりいくらか短い。しかし、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと連結オリゴヌクレオチドとをハイブリダイズさせた後で得られた二本鎖中のニックのために、これらの凝集体は剛性ハイブリッドではなく、極めて可撓性であった。これは、系オーバーラップ鎖を4つから3つに減らす(それによってニックの数を減らす)か、または二本鎖の代わりに三本鎖を用いることにより制御し得る可変要素であることに留意されたい。

【0225】

実施例3：オリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子の調製

実施例1に記載のように金コロイド(直径13nm)を調製した。チオールオリゴヌクレオチド[HS(CH₂)₆OP(O)(O⁻)オリゴヌクレオチド]も実施例1に記載のように調製した。

【0226】

実施例1に記載のチオールオリゴヌクレオチドを金ナノ粒子に付着させる方法は、満足すべき結果をもたらさない場合があることが判明した。特に、長いオリゴヌクレオチドを用いたとき、オリゴヌクレオチドコロイド共役体は、診断系に通常存在するバックグラウンドDNA用のモデルとして用いられる大過剰の高分子量サケ精子DNAの存在下では安定でなかった。コロイドをチオールオリゴヌクレオチドに長く暴露すると、サケ精子DNAに対して安定なオリゴヌクレオチドコロイド共役体が生成したが、得られた共役体は、満足にハイブリダイズしていなかった。さらなる実験により、共役体が高分子DNAに対して安定でありかつ満足にハイブリダイズするように任意の長さのチオールオリゴヌクレオチドを金コロイドに付着させる以下の手順を得た。

【0227】

水中の金コロイド(17nM)の1ml溶液を水中の過剰な(3.68μM)チオールオリゴヌクレオチド(28塩基長)と混合し、混合物を室温下に12~24時間放置した。次いで、100μlの0.1Mリン酸水素ナトリウム緩衝液、pH7.0および100μlの1.0M NaClを予備混合して加えた。10分後、10μlの1%水性NaNO₃を添加し、混合物をさらに40時間放置した。この「熟成」ステップは、チオールオリゴヌクレオチドにより表面被覆面積を増大させて、金表面からオリゴヌクレオチド塩基を置換させるように設計された。その後のアッセイで、40時間のインキュベーション後に溶液をドライアイス浴中で凍結し、次いで室温下に解凍すると、いくらか透明度が増し、境界がよりはっきりした赤色スポットが得られた。どちらにしても、次ぎに、溶液をEppendorf Centrifuge 5414にて14,000rpmで約15分間遠心して、(260nmでの吸光度によって示されている)ほとんどのオリゴヌクレオチドと共に、(520nmでの吸光度により示されている)7~10%の金コロイドを含有する極めて薄いピンク色の上清と、管の底に密で暗色のゼラチン質残留物を得た。上清を除去し、残留物を約200μlの緩衝液(10mMリン酸、1.0M NaCl)中に再懸濁し、再遠心した。上清溶液を除去した後、残留物を1.0mlの緩衝液(10

10

20

30

40

50

mM リン酸、0.1M NaCl) および $10 \mu\text{l}$ の 1% NaNO_3 水溶液中に入れた。溶液をピペットで数回吸い込んだり、吐出したりして溶解を支援した。得られた赤色マスター溶液は、室温下に数ヶ月間放置し、シリカ薄相クロマトグラフィー (TLC) プレート (実施例 4 参照) 上に置き、2M NaCl、10mM MgCl_2 、または高濃度のサケ精子 DNA 含有溶液を添加しても、安定であった (すなわち、赤色を保ち、凝集しなかった)。

【0228】

実施例 4: ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体のハイブリダイゼーションの促進

実施例 3 に記載のように、図 11 に示されているオリゴヌクレオチド-金コロイド共役体 1 および 11 を調製した。これら 2 種の共役体のハイブリダイゼーションは極めて緩慢であった。特に、水性 0.1M NaCl または 10mM MgCl_2 + 0.1M NaCl 中で共役体 1 および 11 試料を混合し、混合物を室温下に 1 日放置しても、変色はほとんどまたは全く生じなかった。

【0229】

2つの方法がハイブリダイゼーションを改善することが分った。最初の方法では、共役体 1 および 11 の混合物 (0.1M NaCl 溶液中に各 15nM を含有) をドライアイス-イソプロピルアルコール浴中で 5 分間凍結し、次いで混合物を室温下に解凍すると、より高速の結果が得られた。解凍した溶液は、青みを帯びた色を示した。標準 C-18 TLC シリカプレート (オールテック・アソシエイツ社 (Alltech Associates)) 上に溶液 $1 \mu\text{l}$ をスポットすると、直ぐに濃青色が見られた。ハイブリダイゼーションおよびその結果として起こる凍結-解凍手順により起こった変色は可逆的であった。ハイブリダイズした溶液を 80°C に加熱すると、溶液は赤色に変わり、TLC プレート上にピンク色のスポットを生成した。次いで、凍結、解凍すると、系は (青色の) ハイブリダイズ状態に戻った (C-18 TLC プレート上の溶液とスポット両方共)。溶液を凍結しなかった同様な実験で、C-18 TLC プレート上で得られたスポットはピンク色であった。

【0230】

高速結果を得る第 2 の方法は、共役体と標的を温める方法である。例えば、別の実験では、0.1M NaCl 溶液中でオリゴヌクレオチド-金コロイド共役体とオリゴヌクレオチド標的配列とを急速に 65°C に温め、20 分かけて室温に冷ました。C-18 シリカプレート上にスポットして、乾燥させると、ハイブリダイゼーションを示す青いスポットが得られた。それに対し、共役体と標的を室温下に 1 時間 0.1M NaCl 中でインキュベートしても、ハイブリダイゼーションを示す青色を生成しなかった。0.3M NaCl 中でのハイブリダイゼーションはさらに高速である。

【0231】

実施例 5: ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を用いたアッセイ

図 12 A-F に示されているオリゴヌクレオチド-金コロイド共役体 1 および 2 は実施例 3 に記載のように作製し、図 12 A に示されているオリゴヌクレオチド標的 3 は、実施例 2 に記載のように作製した。誤対合標的および欠失標的 4、5、6 および 7 は、イリノイ州シカゴ所在のノースウエスタン大学バイオテクノロジー施設 (Northwestern University Biotechnology Facility, Chicago, IL) から購入した。これらのオリゴヌクレオチドを 40nmol スケールで合成し、逆相 C18 カートリッジ (OPC) 上で精製した。それらの純度は、イオン交換 HPLC を実施して定量化した。

【0232】

ストリンジェントな温度に、急速加熱し、次いで急速に冷却して、選択的ハイブリダイゼーションを遂成した。例えば、15nM の各オリゴヌクレオチド-コロイド共役体 1 および 2 と、3nmol の標的オリゴヌクレオチド 3、4、5、6 または 7 を含有する $100 \mu\text{l}$ の 0.1M NaCl + 5mM MgCl_2 を、 74°C に加熱し、以下の表に示されている温度に冷却し、混合物をこの温度で 10 分間インキュベートしてハイブリダイゼー

ションを実施した。次いで、各反応混合物の3 μ l 試料をC-18 T L C シリカプレート上にスポットした。(5分間)乾燥させると、ハイブリダイゼーションが起こった場合には濃青色が現われた。

【0233】

結果を以下の表1に示す。ピンク色のスポットは陰性テスト(すなわち、ナノ粒子がハイブリダイゼーションによって結合しなかったこと)を示し、青色のスポットは陽性テスト(すなわち、ナノ粒子が両オリゴヌクレオチド-コロイド共役体に関するハイブリダイゼーションにより近接させたこと)を示す。

【0234】

【表1】

表1

反応物	結果(色)			
	45℃	50℃	60℃	74℃
1+2	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク
1+2+3 (対合)	青	青	青	青
1+2+4 (半相補的誤対合)	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク
1+2+5 (-6bp)	青	ピンク	ピンク	ピンク
1+2+6 (1bp誤対合)	青	青	ピンク	ピンク
1+2+7 (2bp誤対合)	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク

表1から分るように、60℃のハイブリダイゼーションでは、完全対合標的3の場合のみ青色スポットが得られた。50℃のハイブリダイゼーションでは、標的3と6の両方で青色スポットを生成した。45℃のハイブリダイゼーションでは、標的3、5および6で青色スポットが得られた。

【0235】

関連シリーズにおいて、1誤対合Tヌクレオチドを含む標的は、58℃で陽性テスト(青色)を生成し、共役体1および2は64℃で陰性テスト(赤色)を生成した。同一条件下で、完全対合標的(3)は、どちらの温度下にも陽性テストを生成したが、これは、このテストが完全対合標的と、1誤対合塩基を含む標的とを識別し得ることを示している。

【0236】

異なるハイブリダイゼーション法を用いても同様な結果が得られた。特に、凍結、解凍し、次いで急速にストリンジェントな温度に温めることにより、選択的ハイブリダイゼーションが達成された。例えば、15 nM の各オリゴヌクレオチド-コロイド共役体1および2と、10 pM の標的オリゴヌクレオチド3、4、5、6または7を含有する100 μ l の0.1 M NaClを、ドライアイス-イソプロピルアルコール浴中で5分間凍結し、室温下に解凍し、次いで、急速に以下の表2に示されている温度に冷却し、混合物をこの温度で10分間インキュベートしてハイブリダイゼーションを実施した。次いで、各反応混合物の3 μ l 試料をC-18 T L C シリカプレート上にスポットした。結果を表2に示す。

【0237】

【表2】

10

20

30

40

表 2

反応物 (プローブ) + 標的	結果 (色)				
	RT	35℃	40℃	54℃	64℃
(1+2)+3	青	青	青	青	ピンク
(1+2)	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク
(1+2)+4	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク
(1+2)+5	青	青	ピンク	ピンク	ピンク
(1+2)+6	青	青	青	ピンク	ピンク
(1+2)+7	青	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク

これらの系の重要な特徴は、温度変化に関連する変色が極めて急激であり、かつ約1℃の温度範囲にわたって発生することである。これは、コロイド共役体が関与する融解および会合プロセスにおける高い協同性を示しており、完全対合配列と1塩基対誤対合を含むオリゴヌクレオチド標的を容易に識別し得ることを示している。

【0238】

高い識別度は2つの特徴によるものと考えられる。第1に、陽性シグナルを得るには、標的上の2つの比較的短いプローブオリゴヌクレオチドセグメント(15ヌクレオチド)の整列が必要である。同等な2成分検出系において、どちらかのセグメント中に誤対合があると、もっと長いプローブ(例えば、30塩基長のオリゴヌクレオチド)中の誤対合より不安定になる。第2に、溶液中の標的オリゴヌクレオチドとナノ粒子共役体とのハイブリダイゼーションで得られた260nmでのシグナルは、DNAに基づくものではなく、ナノ粒子に基づいている。このシグナルは、多重オリゴヌクレオチド二本鎖によるポリマー網目構造として組織化されたナノ粒子集合体の解離に依存する。これによって、凝集体の解離に関して観察される温度範囲が、標準DNA熱変性と比べて狭められる。簡単に説明すると、架橋凝集体中の一部の二本鎖は、ナノ粒子を溶液中に分散させることなく解離し得る。したがって、凝集体を融解させる温度範囲は、ナノ粒子を含まない同等な系の融解に関わる温度範囲(12℃)に比べて極めて狭い(4℃)。この検出法のさらに顕著かつ有利な点は、C-18シリカプレート上で観察される比色応答(<1℃)の温度範囲である。原則的に、この3成分ナノ粒子をベースとする方法は、標的核酸とハイブリダイズしている一本鎖プローブをベースとする任意の2成分検出系よりも選択的であろう。

【0239】

100μlのハイブリダイゼーション緩衝液(0.3M NaCl、10mM リン酸、pH7)中で、1nmolの標的3を含有するマスター溶液を調製した。この溶液1μlは、標的オリゴヌクレオチド10pmolに相当する。マスター溶液からアリコートを取り、ハイブリダイゼーション緩衝液で所望の濃度に希釈して、連続希釈を実施した。表3は、プローブ1および2と異なる量の標的3との混合物3μlを用いて得た感度を示している。凍結-解凍条件を用いてハイブリダイゼーションを実施した後、これらの溶液の3μlアリコートをC-18 TLCプレート上にスポットして、色を定量した。以下の表3において、ピンク色は陰性テストを示し、青色は陽性テストを示す。

【0240】

【表3】

表 3

標的の量	結果
1 p m o l	青 (陽性)
2 0 0 f m o l	青 (陽性)
1 0 0 f m o l	青 (陽性)
2 0 f m o l	青 (陽性)
1 0 f m o l	紫がかった色 (曖昧)

この実験は、1 0 f m o l がこの特定の系の検出下限であることを示している。

【0241】

実施例 6： ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を用いたアッセイ

図 1 3 B に示されているように、DNA 修飾ナノ粒子を修飾透明基板上に吸着させた。この方法は、DNA ハイブリダイゼーション相互作用を用いて、DNA 修飾ナノ粒子をガラス基板に付着しているナノ粒子に結合させるステップから成る。

【0242】

ガラス製顕微鏡スライドはフィッシャー・サイエンティフィック社 (F i s h e r S c i e n t i f i c) から購入した。先端にダイヤモンドが付いたけがきベンを用いて、スライドを約 5 × 1 5 m m の部片に切断した。スライドを、5 0 ° C の 4 : 1 H₂ S O₄ : H₂ O 溶液中に 2 0 分間浸漬して清浄した。次いで、スライドを、多量の水、次いでエタノールでリンスし、乾燥窒素流下で乾燥させた。スライド表面をチオール末端シランで官能化するために、スライドを脱気エタノール 1 % (質量) メルカプトプロピルトリメトキシシラン溶液に 1 2 時間浸漬した。スライドをエタノール溶液から取り出し、エタノール、次いで水でリンスした。直径 1 3 n m の金ナノ粒子を含有する溶液 (実施例 1 に記載の配合物) にナノ粒子を浸漬して、スライドのチオール末端表面上に吸着させた。コロイド溶液中で 1 2 時間後、スライドを取り出し、水でリンスした。得られたスライドは、吸着されたナノ粒子に帰するピンク色を有し、水性金ナノ粒子コロイド溶液と同様な UV-可視吸光度プロファイル (5 2 0 n m での表面プラズモン吸光度ピーク) を示す。図 1 4 A 参照。

【0243】

ガラス製スライドを、新たに精製された 3' チオールオリゴヌクレオチド (3' チオール A T G C T C A A C T C T [配列番号 3 3] (実施例 1 および 3 に記載のように合成) を含有する 0. 2 O D (1. 7 μ M) 溶液中に浸漬して、DNA をナノ粒子修飾表面に付着させた。1 2 時間浸漬させた後、スライドを取り出し、水でリンスした。

【0244】

検体 DNA 鎖がナノ粒子を修飾表面に結合させる能力を証明するために、連結オリゴヌクレオチドを調製した。(実施例 2 に記載のように調製した) 連結オリゴヌクレオチドは、既に基板表面上に吸着されている DNA (配列番号 3 3) と相補的な 1 2 b p 末端を有する配列を含む 2 4 b p 長 (5' T A C G A G T T G A G A A T C C T G A A T G C G) [配列番号 3 4] であった。次いで、基板を、連結オリゴヌクレオチド (0. 4 O D、1. 7 μ M) を含有するハイブリダイゼーション緩衝液 (0. 5 M N a C l、1 0 m M リン酸緩衝液 p H 7) 溶液中に 1 2 時間浸漬した。基板を取り出し、類似緩衝液でリンスした後、基板を、基板に付着している連結オリゴヌクレオチドのハイブリダイズしていない部分と相補的なオリゴヌクレオチド (T A G G A C T T A C G C 5' チオール [配列番号 3 5]) (実施例 3 に記載のように調製) で修飾された直径 1 3 n m の金ナノ粒子を含有する溶液中に浸漬した。1 2 時間浸漬した後、基板を取り出し、ハイブリダイゼーション緩衝液でリンスした。基板の色は紫色に変わっており、5 2 0 n m での UV-可視吸光度はほぼ二倍になった (図 1 4 A)。

【0245】

10

20

30

40

50

オリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子が、連結オリゴヌクレオチドとのDNAハイブリダイゼーション相互作用によりオリゴヌクレオチド/ナノ粒子修飾表面に付着したことを確認するために、融解曲線を作成した。融解実験のために、基板を1 mlのハイブリダイゼーション緩衝液を含有するキュベットに入れ、実施例2のパートBで用いたものと同じ装置を用いた。基板の温度を0.5℃/分の速度で増大させながら、ナノ粒子に帰する吸光度シグナル(520 nm)をモニターした。温度が60℃を越えたときに、ナノ粒子のシグナルは劇的に低下した。図14B参照。シグナルの一次導関数は62℃の融解温度を示したが、これは、ナノ粒子を含まない溶液中でハイブリダイズした3つのDNA配列に関して見られた温度と一致する。図14B参照。

【0246】

実施例7: ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を用いたアッセイ

図15A-Gに示されている検出系は、2種のプローブ1および2が相補的標的4上に末端同士で整列するように設計した。これは、2つのプローブが標的鎖上に近接して整列している実施例5に記載の系とは異なる(図12A-D参照)。

【0247】

図15A-Gに示されているオリゴヌクレオチド-金ナノ粒子共役体は、実施例3に記載のように調製したが、但し、ナノ粒子は、ハイブリダイゼーション緩衝液(0.3M NaCl, 10mM リン酸, pH7)に再分散させた。最終ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体濃度は、赤色のナノ粒子を生成する522nmでの表面プラズモンバンド強度の低下を測定して、13nMであると予測した。図15A-Gに示されているオリゴヌクレオチド標的は、イリノイ州エバンストン所在のノースウエスタン大学バイオテクノロジー施設(Northwestern University Biotechnology Facility, Evanston, IL)から購入した。

【0248】

13nM オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体1および2を含有するハイブリダイゼーション緩衝液150μlと、60pmol(60μl)の標的4とを混合すると、溶液の色は直ぐに赤色から紫色に変化した。この変化は、金ナノ粒子の大きなオリゴヌクレオチド結合ポリマー網目構造の形成の結果として起こり、これは、ナノ粒子の表面プラズモン共鳴の赤色シフトをもたらす。溶液を2時間にわたって放置すると、大きな巨視的性質の凝集体の沈殿が観察された。懸濁凝集体を含む溶液の「融解分析」を実施した。「融解分析」を実施するために、溶液をハイブリダイゼーション緩衝液で1mlに希釈し、温度を25℃から75℃まで上昇させながら、1分/1℃の保持時間で、260nmでの凝集体の光学シグナチャーを1分間隔で記録した。53.5℃の「融解温度」(T_m)で、オリゴヌクレオチド-ナノ粒子ポリマーとしての凝集体の特性決定と一致する、特徴的な急激な転移(半値全幅、一次導関数の $FW_{1/2} = 3.5^\circ C$)が観察された。これは、ナノ粒子を含まないオリゴヌクレオチドに関して観察されたもっとも広幅の転移($T_m = 54^\circ C$ 、 $FW_{1/2} \sim 13.5^\circ C$)に関連する T_m に十分匹敵する。ナノ粒子を含む分析と類似の条件下に、ナノ粒子を含まないオリゴヌクレオチド溶液の「融解分析」を実施したが、但し、温度は10℃から80℃まで増大させた。また、溶液の各オリゴヌクレオチド成分は1.04μMであった。

【0249】

系の選択性をテストするために、プローブ1と2の完全相補体4から形成された凝集体の T_m を、1半塩基誤対合、欠失または挿入を含む標的から形成された凝集体の T_m' と比較した(図15A-G参照)。不完全標的を含むすべての金ナノ粒子-オリゴヌクレオチド凝集体は、種々の凝集体の T_m 値によって証明されているように、完全相補体から形成された凝集体と比べて、有意な測定可能不安定化を示した(図15A-G参照)。不完全標的を含有する溶液は、52.5℃に保持された水浴に入れたときのそれらの色によって完全相補体を含有する溶液から容易に区別し得る。この温度は、誤対合ポリヌクレオチドの T_m より高く、したがって、完全標的を含有する溶液のみがこの温度下に紫色を呈した。半相補的標的を含むプローブ溶液に関しても「融解分析」を実施した。260nmでの

10

20

30

40

50

吸光度は極くわずかに増大したことが観察された。

【0250】

次いで、ハイブリダイゼーション緩衝液中に $50\mu\text{l}$ の各プローブ (13nM) を含有する溶液に、 $2\mu\text{l}$ (20pmol) の各オリゴヌクレオチド標的 (図15A-G参照) を加えた。室温下に15分間放置した後、溶液を、温度制御水浴に移し、以下の表4に示されている温度下に5分間インキュベートした。次いで、各反応混合物の $3\mu\text{l}$ 試料をC-18シリカプレート上にスポットした。凝集、したがって変色を誘発させるためには両プローブを標的上で整列させる必要があることを証明するために、2回の対照実験を行った。1回目の対照実験は、標的が存在しないプローブ1とプローブ2とから構成した。2回目の対照実験は、一方のプローブ配列のみと相補的な標的3を含むプローブ1とプローブ2とから構成した (図15B参照)。結果は以下の表4に示されている。ピンク色のスポットは陰性テストを示し、青色のスポットは陽性テストを示している。

【0251】

注目すべきは、肉眼で検出し得る比色変化は、 1°C 未満にわたって発生し、それによって、完全標的4は、誤対合(5および6)、末端欠失(7)および2種のオリゴヌクレオチドプローブが会合する標的個所での1単塩基の挿入(8)を有する標的から容易に区別し得る (表4参照) ことである。比色変化 T_m は、 T_m と温度では近いが、同一ではない。どちらの対照の場合も、すべての温度下に観察されたピンクがかった赤色によって証明されるように、溶液中の粒子の凝集または不安定性の徴候はなく、すべての温度下のプレートテストで陰性スポット (ピンク色) を示した (表4)。

【0252】

1単塩基挿入標的8が完全相補性標的4から区別し得るという観察結果は、2種のプローブ配列を有する挿入鎖の完全相補性を考えれば、本当に注目すべきことである。8およびナノ粒子プローブから形成された凝集体の不安定化は、2つの短いプローブの使用と、完全相補性標的にハイブリダイズしたときにプローブの末端が会合する2つのチミジン塩基間の塩基の積み重ねの喪失とによるようである。同等条件 ($T_m = 51^\circ\text{C}$) 下に3塩基対挿入 (CCC) を含む標的をプローブとハイブリダイズさせると、類似の結果が観察された。実施例5で上述した系において、塩基挿入を有する標的は、完全相補性標的から区別できなかった。したがって、この実施例に記載されている系は選択性の点で極めて好ましい。また、この系は、増幅技術を用いずにおよそ 10fmol の実施例5に記載の系と同じ感度を示した。

【0253】

これらの結果は、標的鎖に沿った任意の1単塩基誤対合と共に、標的鎖への任意の挿入をも検出し得ることを示している。変色を検出し得る温度範囲は極めて急勾配であり、変化は極めて狭い温度範囲にわたって生じる。この急激な変化は、標的オリゴヌクレオチド鎖を介して結合された大きなコロイド網目構造が関与する融解プロセスに大きな協同度が存在することを示している。これは、データで示されているように顕著な選択性をもたらす。

【表4】

表 4

反応物(プロブ) + 標的	結果 (色)					
	R T	47.6℃	50.5℃	51.4℃	52.7℃	54.5℃
(1+2)	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク
(1+2)+3	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク
(1+2)+4	青	青	青	青	青	ピンク
(1+2)+5	青	青	青	ピンク	ピンク	ピンク
(1+2)+6	青	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク
(1+2)+7	青	青	青	青	ピンク	ピンク
(1+2)+8	青	青	ピンク	ピンク	ピンク	ピンク

10

【0254】

実施例 8： ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を用いたアッセイ

「充填」二本鎖オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションを含む 1 式の実験を行った。図 16A に示されているナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体 1 および 2 を、図 16A-C に示されているような種々の長さの標的 (24、48 および 72 塩基長) および相補的フィラーオリゴヌクレオチドと共にインキュベートした。条件は、その他の点では、実施例 7 に記載の通りであった。また、オリゴヌクレオチドとナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体は実施例 7 に記載のように調製した。

20

【0255】

予測したように、異なる反応溶液は、ハイブリダイゼーション後に、金ナノ粒子の間隔依存性光学特性による顕著に異なる光学特性を有していた。以下の表 5 参照。しかし、これらの溶液を C-18 TLC プレート上にスポットして、室温または 80℃ で乾燥させると、標的オリゴヌクレオチドの長さや金ナノ粒子間の間隔とは無関係に、青色を呈色した。表 5 参照。これは、固相支持体がハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体の凝集を促進するために起こると思われる。これは、溶液を TLC プレート上にスポットすることにより、金ナノ粒子間の間隔がかなり (少なくとも 72 塩基) になるが、それでも比色検出が可能であることを証明している。

30

【0256】

【表 5】

表 5

標的の長さ	結果 (色)	
	溶液	TLC プレート
24 塩基	青	青
48 塩基	ピンク	青
72 塩基	ピンク	青
プローブ 1+2 のみ	ピンク	ピンク

40

この実施例や他の実施例で観察された変色は、金ナノ粒子間の間隔 (粒子間間隔) がナノ粒子の直径とほぼ同じかそれより小さいときに起こる。したがって、ナノ粒子のサイズ、ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドのサイズ、およびナノ粒子を標的核酸にハイブリダイズさせるときのナノ粒子の間隔は、オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体が核酸標的とハイブリダイズして凝集体を形成するときに変色が観察可能であるかどうかに影響を与える。例えば、13 nm の直径を有する金ナノ粒子は、長さが 10 ~ 35 ヌクレオチ

50

ドの標的配列とハイブリダイズするように設計されたナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドを用いて凝集させると、変色を生じるであろう。ナノ粒子を標的核酸にハイブリダイズさせたときに変色を生じさせるのに適したナノ粒子間隔は、結果が証明しているように、凝集の度合いに応じて異なるであろう。これらの結果はさらに、固体表面が既に凝集している試料の凝集をさらに促進し、金ナノ粒子をさらに近接させることを示している。

【0257】

金ナノ粒子に関して観察された変色は、金の表面プラズモン共鳴のシフトや広がりによるものであり得る。この変色は直径が約4 nm未満の金ナノ粒子に関して起こる可能性はありそうにない。というのは、核酸の特異的検出に必要なオリゴヌクレオチドの長さがナノ粒子の直径を超えるからである。

【0258】

実施例9: ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を用いたアッセイ

それぞれプローブ1と2 (図12A) から5 μ lを緩衝液(10 mM リン酸、pH 7)と合わせて0.1 M NaClの最終濃度とし、この溶液にヒト尿1 μ lを添加した。この溶液を凍結、解凍し、次いでC-18 TLCプレート上にスポットしたが、青色は発生しなかった。12.5 μ lの各プローブと、2.5 μ lのヒト尿を含有する類似溶液に、0.25 μ l (10 pmol)の標的3 (図12A)を加えた。溶液を凍結、解凍し、次いでC-18 TLCプレート上にスポットすると、青色スポットが得られた。

【0259】

ヒト唾液の存在下で類似実験を行った。12.5 μ lの各プローブ1および2と、2および2.5 μ lの標的3を含有する溶液を70℃に加熱した。室温に冷ました後、2.5 μ lの唾液溶液(水で1:10希釈したヒト唾液)を加えた。得られた溶液を凍結、解凍し、次いで、C-18 TLCプレート上にスポットした後、プローブと標的のハイブリダイゼーションを示す青色スポットが得られた。標的を加えなかった対照実験では、青色スポットは観察されなかった。

【0260】

実施例10: ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を用いたアッセイ

図13Aに示されているようにアッセイを実施した。まず、フィッシャー・サイエンティフィック社から購入したガラス製顕微鏡スライドを先端にダイヤモンドが付いたけがきペンで約5×15 mmの薄片に切断した。スライドを50℃の4:1のH₂SO₄:H₂O₂溶液中に20分間浸漬して洗浄した。次いで、スライドを多量の水、次いでエタノールでリンスし、乾燥窒素流下で乾燥させた。改変した文献記載手順(Chrisseyら, Nucleic Acids Res., 第24巻, 3031-3039ページ(1996年))を用いてチオール修飾DNAをスライド上に吸着させた。まず、スライドを、室温下に、Nanopure水中の1 mM酢酸中のトリメチルシリルプロピルジエチルトリアミン1%溶液(DETA、ペンシルベニア州プリストン所在のユナイテッド・ケミカル・テクノロジー社(United Chemical Technology, Bristol, PA)から購入)中に20分間浸漬した。スライドを水、次いでエタノールでリンスした。乾燥窒素流で乾燥させた後、温度制御加熱ブロックを用いて120℃で5分間焼成した。スライドを冷まし、次いで、室温下に2時間、80:20メタノール:ジメチルキシルホキシド中1 mMのスクシニミジル-4-(マレインミドフェニル)ブチレート(SMPB、シグマ・ケミカルズ社(Sigma Chemicals)から購入)中に浸漬した。SMPB溶液から取り出して、エタノールでリンスした後、SMPB架橋剤と結合しなかったアミン部位に以下のようにキャップ形成した。まず、スライドを、10% 1-メチルイミダゾールを含有する8:1 THF:ピリジン溶液中に5分間浸漬した。次いで、スライドを、9:1 THF:無水酢酸溶液中に5分間浸漬した。これらのキャッピング溶液は、ヴァージニア州スターリング所在のグレン・リサーチ社から購入した。スライドをTHF、次いでエタノール、最後に水でリンスした。

【0261】

10

20

30

40

50

修飾ガラス製スライドを、新たに精製されたオリゴヌクレオチド(3' チオールATGCTCAACTCT [配列番号33])を含有する0.2 OD (1.7 μ M) 溶液中に浸漬して、DNAを表面に付着させた。12時間浸漬した後、スライドを取り出し、水でリンスした。

[0262]

検体DNA鎖がナノ粒子を修飾基板表面に結合させる能力を証明するために、連結オリゴヌクレオチドを調製した。連結オリゴヌクレオチドは、既に基板表面上に吸着されているDNAと相補的な12bp末端を含む配列を有する24bp長(5' TACGAGTTGAGAAATCCTGAATGCG) [配列番号34]であった。次いで、基板を、連結オリゴヌクレオチド(0.4 OD、1.7 μ M)を含有するハイブリダイゼーション緩衝液(0.5 M NaCl, 10 mM リン酸緩衝液 pH7) 溶液中に12時間浸漬した。基板を取り出し、類似緩衝液でリンスした後、基板を、基板に付着している連結オリゴヌクレオチドのハイブリダイズしていない部分と相補的なオリゴヌクレオチド(TAGGAC TTACGC5' チオール [配列番号35])で修飾されている直径13 nmの金ナノ粒子を含有する溶液中に浸漬した。12時間浸漬した後、基板を取り出し、ハイブリダイゼーション緩衝液でリンスした。ガラス製基板の色は透明な無色から透明なピンク色になっていた。図19A参照。

[0263]

スライドを上記のような連結オリゴヌクレオチド溶液に浸漬し、次いで、オリゴヌクレオチド(3' チオールATGCTCAACTCT [配列番号33])が付着している直径13 nmの金ナノ粒子を含有する溶液に浸漬して、スライドに追加のナノ粒子層を加えた。12時間浸漬した後、上記のように、スライドをナノ粒子溶液から取り出し、リンスして、ハイブリダイゼーション緩衝液中に浸漬した。スライドの色は、はっきり分るほど赤色に濃くなっていた。図19A参照。最終ナノ粒子層としてオリゴヌクレオチド(TAGGAC TTACGC5' チオール [配列番号35])で修飾した13 nmの金ナノ粒子を用いて連結オリゴヌクレオチドおよびナノ粒子浸漬手順を繰り返して最終ナノ粒子層を加えた。この場合も、色は濃くなり、520 nmのUV-可視吸光度は増大した。図19A参照。

[0264]

オリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子が連結オリゴヌクレオチドとのDNAハイブリダイゼーション相互作用によりオリゴヌクレオチド修飾表面に付着したことを確認するために、融解曲線を作成した。融解実験のために、スライドを、1.5 mlのハイブリダイゼーション緩衝液を含有するキューベットに入れ、実施例2のパートBで用いたものと類似の装置を用いた。基板の温度を20℃から80℃まで増大させながら、1℃/1分の保持時間で行ったとき、ナノ粒子のシグナルは劇的に低下した。図19B参照。シグナルの一次導関数は、55℃の融解温度を示したが、これは、溶液中でハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体と連結オリゴヌクレオチドに関して見られた温度と一致する。図19B参照。

[0265]

実施例11: プローブとしてナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を用いたポリリボヌクレオチドアッセイ

これまでの実施例は、アッセイにおける標的としてオリゴデオキシリボヌクレオチドを利用した。本実施例は、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体をポリリボヌクレオチドアッセイにおけるプローブとして用い得ることを証明する。ポリ(rA)(0.00426 μ mol/L)の溶液1 μ lを、5'末端のメルカプトアルキルリンカーを介してdT₂₀(チミジレート残基を含有する20merオリゴヌクレオチド)に結合している100 μ lの金ナノ粒子(粒子中~10 nm)に加えて、実験を行った。結合手順は、実施例3に記載のものであった。実施例4に記載のように、ドライアイス/イソプロピルアルコール浴中で凍結し、室温下で解凍し、C18 TLCプレート上にスポットした後、ハイブリダイ

10

20

30

40

50

ゼーションによるナノ粒子の凝集の特徴を示す青色スポットが観察された。標的の不在下に実施した対照実験では、青色スポットではなく、ピンク色のスポットを得た。

【0266】

実施例 12: ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体を用いた炭疽菌保護抗原セグメントのアッセイ

多くの場合、PCRによる二本鎖DNA標的の増幅にはアッセイに十分な材料を提供することが必要である。本実施例は、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体が、DNA鎖をその相補体の存在下にアッセイする（すなわち、二本鎖標的の熱ハイブリダイゼーション後に一本鎖に関してアッセイする）ために使用し得、かつPCR反応から得られたアンプリコンを認識して、特異的に結合し得ることを証明する。

10

【0267】

炭疽菌の保護抗原セグメントの141塩基対二本鎖アンプリコンを含有するPCR溶液は海軍省(Navy)から提供された(図12に示されている配列)。このアンプリコンのアッセイは、Qiaquick Nucleotide Removal Kit(カリフォルニア州サンタ・クラリタ所在のキアゲン社(Qiagen, Inc., Santa Clarita, CA))およびこのキット用の標準プロトコルを用いて、100 μ lのPCR溶液からDNAを単離して実施したが、但し、DNAの溶離は、キットで提供された緩衝液を用いるのではなく、pH8.5の10mMリン酸緩衝液を用いて実施した。次いで、Speed Vac(サバント社(Savant))上で溶離液を蒸発乾固した。この残留物に、2種の異なるオリゴヌクレオチド-ナノ粒子ブロープ(図23参照)からなる2種の各溶液を等量混合して調製した5 μ lのマスター混合物を添加した。各オリゴヌクレオチド-ナノ粒子ブロープは、実施例3に記載のように調製した。マスター混合物を形成するために含ませたブロープ溶液は、10 μ lの2M NaClおよび5 μ lのオリゴヌクレオチドブロッカー溶液(0.3M NaCl、10mMリン酸、pH7.0溶液中50pmolの各ブロッカーオリゴヌクレオチド(図23および以下参照))を、5 μ lの全強度(約10nM)のナノ粒子-オリゴヌクレオチド溶液に加えて調製した。アンプリコン-ブロープ混合物を3分間で100℃に加熱し、次いで、ドライアイス/エタノール浴中で凍結し、室温に解凍した。小アリコート(2 μ l)をC18 TLCプレート上にスポットし、乾燥させた。ハイブリダイゼーションを示す濃い青色のスポットを得た。

20

30

【0268】

アンプリコン標的の不在下、ブロープ1の不在下、ブロープ2の不在下、または塩化ナトリウムの不在下に、同様な方法で対照テストを実施したが、すべて陰性、すなわち、ピンク色のスポットを得た。同様に、保護抗原セグメントの代わりに炭疽菌の致死因子セグメント由来のPCRアンプリコンを含むブロープ1および2を用いて実施したテストは陰性(ピンク色のスポット)。これらの対照により、どちらのブロープも必要不可欠であり、ハイブリダイゼーションに適した塩条件が必要であり、かつテストは特定の標的配列特異的であることが確認された。

【0269】

初期二本鎖標的の第2鎖(すなわち、標的鎖と相補的な鎖)がブロープに結合するセグメントの外側の標的核酸領域に結合するのを阻止するためにオリゴヌクレオチドブロッカーを付加した(配列に関しては図23参照)。というのは、そのような結合はナノ粒子オリゴヌクレオチドブロープと標的鎖との結合に干渉するからである。この実施例では、ブロッカーオリゴヌクレオチドは、ブロープによって被覆されない領域の一本鎖標的と相補的であった。代替計画は、ブロープオリゴヌクレオチドと競合する領域外のPCR相補鎖(標的鎖と相補的な鎖)と相補的なブロッカーオリゴヌクレオチドを用いるものである。

40

【0270】

実施例 13: PCR溶液からアンプリコンを単離しないPCRアンプリコンの直接アッセイ

実施例 12に記載の手順は、ナノ粒子-オリゴヌクレオチドブロープを付加する前にPCR

50

R 溶液から PCR アンプリコンを分離するステップを含むものであった。多くの目的のためには、前以てポリヌクレオチド産物を単離することなく、PCR 溶液中で直接アッセイを実施し得ることが望ましいであろう。そのようなアッセイ用のプロトコルが開発されており、それを以下に説明する。このプロトコルは、Amplitaq DNA ポリメラーゼを含む Gene Amp PCR Reagent Kit を用い、標準条件下に誘導されたいくつかの PCR 産物を使って首尾良く実施されている。

【0271】

50 μ l の PCR 試料溶液に、2 種の金ナノ粒子-オリゴヌクレオチドプローブ（それぞれ 0.008 A₅₂₀ 単位）の混合物 5 μ l を添加し、次いで、1 μ l のブロッカーオリゴヌクレオチド（各 10 pmol）と、5 μ l の 5M NaCl と、2 μ l の 150 mM

MgCl₂ を加えた。この混合物を 100°C 下に 2 分間加熱して二本鎖標的の鎖を分離し、管を直接冷浴（例えば、ドライアイス/エタノール）に 2 分間浸漬し、次いで、管を取り出して、溶液を室温下に解凍した（凍結-解凍サイクルにより、プローブと標的オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションが容易になる）。最後に、数 μ l の溶液をプレート（例えば、C18 RPTLC プレート、シリカプレート、ナイロン膜など）上にスポットした。例の通り、青色は PCR 溶液中の標的核酸の存在を示し、ピンク色はこの標的に関して陰性である。

【0272】

実施例 14：ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体の集合体を用いた、デハイブリダイゼーションを行わない二本鎖オリゴヌクレオチドの直接認識

これ以前の実施例では、ナノ粒子に結合している一本鎖オリゴヌクレオチドプローブと相互作用させる一本鎖を生成するために、二本鎖標的を加熱してデハイブリダイズさせた。本実施例は、二本鎖複合体を形成する場合、前以て標的をデハイブリダイズさせなくても、二本鎖オリゴヌクレオチド配列がナノ粒子によって認識され得ることを証明する。

【0273】

2 種の異なる系、ポリ A：ポリ U および dA₄₀：dT₄₀ を用い、100 μ l の緩衝液（0.1M NaCl、10mM リン酸、pH 7.0）中に 0.8 A₂₆₀ 単位の標的二本鎖を含有する溶液 1 μ l を、0.3M NaCl、10mM リン酸緩衝液（pH 7.0）中の Au-sd T₂₀ ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体（粒子中 ~10nm；実施例 11 参照）のコロイド溶液 100 μ l に加えて、テストを実施した。その後、管をドライアイス/イソプロピルアルコール浴中に浸漬して急速凍結し、管を浴から取り出して解凍して、室温（22°C）下に放置し、次いで、3 μ l の溶液を C18 TLC プレート上にスポットして、ナノ粒子のハイブリダイゼーションおよび凝集の特徴を示す青色のスポットを得た。

【0274】

このテストの原理は、（この実施例ではピリミジンオリゴヌクレオチドを担持する）ナノ粒子プローブが、配列特異的に、二本鎖標的に沿ったプリンオリゴヌクレオチド/ピリミジンオリゴヌクレオチド部位で結合することである。各二本鎖体上の多くの結合部位が利用可能なので、結合によって、ナノ粒子凝集体が形成される。これらの結果は、ナノ粒子プローブを含む二本鎖複合体をベースとするこのアッセイが、オリゴボクヌクレオチド二本鎖標的にも、オリゴデオキシリボヌクレオチド二本鎖標的にも機能することを示している。

【0275】

実施例 15：蛍光検出と比色検出とを用いるアッセイ

すべてのハイブリダイゼーション実験は、0.3M NaCl、10mM リン酸、pH 7.0、緩衝液中で実施した。Acetate PlusTM 濾過メンブレン（0.45 μ m）は、マサチューセッツ州ウエストボロ所在のミクロン・セパレーションズ社（Micron Separations Inc., Westboro, MA）から購入した。アルキルアミン官能化ラテックスミクロスフェア（3.1 μ m）は、インディアナ州フィッシャーズ所在のバングス・ラボラトリーズ社（Bangs Laboratories

10

20

30

40

50

、Fishers, IN)から購入した。Amino-Modifier C7 CPG 固相支持体 (グレン・リサーチ社) および Expedite 8909 合成機上の 5'-フルオロセインホスホロアミダイト (6-FAM, グレン・リサーチ社) を使う標準ホスホロアミダイト化学 (Eckstein 編, *Oligonucleotides and Analogues*, 第1版, Oxford University, New York, N. Y., 1991年) を用いて、3' 末端をアルキルアミノ基で官能化した発蛍光固相標識オリゴヌクレオチドを合成し、逆相 HPLC で精製した。これらのオリゴヌクレオチドを、Charreyreら, *Langmuir*, 第13巻, 3103-3110 ページ (1997年) に記載のようにジチオ尿素結合を生成するジソチオシアネートカップリングを用いて、アミノ官能化ラテックスミクロスフェアに付着させた。簡単に説明すると、1000倍過剰の 1, 4-フェニレンジチオシアネートの DMF 溶液を、アミノ修飾オリゴヌクレオチドの水性ホウ酸緩衝液 (0.1 M, pH 9.3) に加えた。数時間後、過剰な 1, 4-フェニレンジチオシアネートをブタノールで抽出し、水溶液を凍結乾燥した。活性化オリゴヌクレオチドをホウ酸緩衝液に再溶解させて、炭酸緩衝液 (0.1 M, pH 9.3, 1 M NaCl) 中でアミノ官能化ラテックスミクロスフェアと反応させた。12時間後、粒子を遠心分離し、緩衝塩類溶液 (0.3 M NaCl, 10 mM リン酸, pH 7.0) で3回洗浄した。5'-オリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子を実施例3に記載のように調製した。

【0276】

標的オリゴヌクレオチド (1~5 μ l, 3 nM) を、3 μ l の発蛍光固相標識オリゴヌクレオチド修飾ラテックスミクロスフェアブロープ溶液 (3.1 μ m; 100 fM) に添加した。5分後、3 μ l の 5'-オリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子ブロープ溶液 (13 nm; 8 nM) を、標的およびラテックスミクロスフェアブロープを含有する溶液に加えた。さらに10分間放置した後、ブロープと標的とを含有する溶液を Acetate Plus メンブレンに通じて真空濾過した。メンブレンは、比較的大きいラテックス粒子を保持し、ハイブリダイズしなかった金ナノ粒子ブロープはすべて通過させた。十分な濃度の標的と、標的にハイブリダイズしたラテックスミクロスフェアおよび金ナノ粒子との存在下、メンブレン上に赤色スポットが観察された (陽性結果)。標的オリゴヌクレオチドを含有する溶液のアリコート等を等量の水に代えた対照実験を常に行った。この場合、メンブレン上には白色スポットが残された (陰性結果)。24塩基対モデル系の場合、比色計で 3 fmol の標的オリゴヌクレオチドを肉眼検出できた。

【0277】

二本鎖標的オリゴヌクレオチド (1~5 μ l, 20 nM)、3 μ l の発蛍光固相標識オリゴヌクレオチド-ラテックスミクロスフェア (3.1 μ m; 100 fM) および 3 μ l の 5'-オリゴヌクレオチド-金ナノ粒子 (13 nm; 8 nM) を合わせ、3分間で100℃に加熱した。次いで、直ぐに溶液を含有する反応容器を液体 N₂ 浴に3分間浸漬して凍結した。次いで、この溶液を室温下に解凍し、上記のように濾過した。24塩基対のモデル系に関して、比色計で、20 fmol の二本鎖オリゴヌクレオチドが肉眼検出できた。

【0278】

蛍光によってモニターする場合、上記検出法はメンブレンからのバックグラウンド蛍光のために困難であることが証明された。この問題は、アリコートを逆相 TLC プレート上にスポットする前に過剰な金ナノ粒子ブロープを除去するためにラテックスミクロスフェアを遠心して「洗浄」することによって克服された。ハイブリダイゼーション実験を上述のように実施した。ブロープと標的とのハイブリダイゼーションを実施した後、溶液に 10 μ l の緩衝液を添加し、次いで、10,000 \times g で2分間遠心した。上清を除去し、沈殿物の再懸濁を支援するために 5 μ l の緩衝液を添加した。次いで、3 μ l のアリコートを逆相 TLC プレート上にスポットした。一本鎖オリゴヌクレオチドと二本鎖標的オリゴヌクレオチドのどちらに関しても、比色計により 25 fmol が肉眼検出できた。スポットの形成に用いた 3 μ l のアリコート中の標的の量が 50 fmol の低さになるまで、ハンドヘルド UV ランプを用いて肉眼で蛍光スポットを視ることができた。この系を最適化する

ことにより、もっと低量の標的核酸の検出も可能になるであろう。

【0279】

実施例16： 銀染色法を用いたアッセイ

溶液中の特定のDNA配列の存在を検出するためには、一般に、オリゴヌクレオチド修飾基板上のDNAハイブリダイゼーションテストが用いられる。遺伝子情報を精査するための組合せDNA配列の有望性が増してきていることは、未来の科学に対するこれらの異種配列アッセイの重要性を物語っている。ほとんどのアッセイにおいて、発蛍光団標識標的と表面結合プローブとのハイブリダイゼーションは、蛍光顕微鏡検査またはデンシトメーター検査によりモニターされている。蛍光検出は極めて感度が良いが、その使用は、実験装置費用とほとんどの慣用基板からのバックグラウンド放射とにより制限される。さらに、1単塩基誤対合を有するものに比べ完全相補性プローブに対する標識オリゴヌクレオチド標的への選択性の方が低いために、ヌクレオチド多形を検出するための表面ハイブリダイゼーションテストが使用できない。蛍光法の簡易性、感度および選択性が改良された検出計画によって、組合せ配列の全ての可能性を具現化することができる。本発明はそのような改良型検出計画を提供する。

【0280】

例えば、3成分サンドイッチアッセイにおいて、オリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子と非修飾DNA標的を、ガラス基板上に付着しているオリゴヌクレオチドプローブとハイブリダイズさせることができた(図25A-B参照)。ナノ粒子は、個別のもの(図25A参照)であっても、複数のナノ粒子の「ツリー」(tree)(図25B参照)であってもよい。「ツリー」は、個別のナノ粒子に比べてシグナル感度を増大させ、ハイブリダイズした金ナノ粒子の「ツリー」は、ガラス基板上の暗色領域として肉眼で観察できることが多い。「ツリー」を用いない場合、または「ツリー」によって生成されたシグナルを増幅させるためには、ハイブリダイズした金ナノ粒子を銀染色溶液で処理し得る。「ツリー」は、染色プロセスを促進し、個別ナノ粒子に比べて標的核酸の検出をより高速にする。

【0281】

以下は、(図25Aに例示されている)1つの特定の系の説明である。捕獲オリゴヌクレオチド(3'-HS(CH₂)₃-A₁₀ATGCTCAACTCT;配列番号43)を、実施例10に記載のように、ガラス基板上に固定した。標的オリゴヌクレオチド(5'-TACGAGTTGAGAAATCCTGAATGCG-3'、配列番号44、各実験用に以下の表6に示されている濃度)と捕獲オリゴヌクレオチドとを、実施例10に記載のように、0.3M NaCl、10mM リン酸緩衝液中でハイブリダイズさせた。基板を同一緩衝液で2回リンスし、標的相補性DNA(5'-HS(CH₂)₅-A₁₀CGCAATTCAGGAT、配列番号45)(実施例3に記載の配合物)で官能化した金ナノ粒子プローブを含有する溶液中に12時間浸漬した。次いで、基板を0.3M NaNO₃で何回もリンスしてCl⁻を除去した。次いで、基板を銀染色溶液(Silver Enhancer Solution AとBの1:1混合物、シグマ・ケミカル社、#S-5020および#S-5145)で3分間現像した。グレースケール測定値を計算し得るソフトウェア(例えば、Adobe Photoshop)をロードしたコンピュータに連結した(通常、文書をコンピュータにスキャンするのに用いられる)平台型スキャナで基板をスキャンしてグレースケール測定を行った。結果を以下の表6に示す。

【表6】

10

20

30

40

表 6

標的DNA濃度	平均グレースケール	標準偏差
10 nM	47.27	2.10
5 nM	53.45	0.94
2 nM	54.56	1.17
1 nM	59.98	1.82
500 pM	61.61	2.26
200 pM	90.06	3.71
100 pM	99.04	2.84
50 pM	135.20	7.49
20 pM	155.39	3.66
無し(対照)	168.16	10.03

【0282】

実施例17: 量子ドットを含む集合体

この実施例は、半導体ナノ粒子量子ドット(QD)上の合成一本鎖DNAの固定化を説明する。天然CdSe/ZnSコア/シェルQD(～4nm)は有機媒質にのみ可溶であるために、アルキルチオールを末端基とする一本鎖DNAと直接反応しにくい。この問題は、まず、QDに3-メルカプトプロピオン酸でキャップ形成することにより回避された。次いで、カルボン酸基を4-(ジメチルアミノ)ピリジンで脱保護して、粒子を水溶性とし、QDと、3'-プロピルチオールまたは5'-ヘキシルチオール修飾オリゴヌクレオチド配列とを反応し易くした。DNA修飾後、透析により、反応しなかったDNAから粒子を分離した。次いで、「リンカー」DNA鎖を表面結合配列とハイブリダイズさせて、長いナノ粒子集合体を生成した。TEM、UV/可視分光法および蛍光顕微鏡検査により特性決定したQD集合体は、溶液温度を制御することにより可逆的に集合させ得る。新規QD集合体およびQDと金ナノ粒子(～13nm)間に形成された複合凝集体の温度依存性UV-可視スペクトルを得た。

【0283】

A. 一般法

NANO pure 超純水精製系を用いて調製したナノピュア水(18.1MΩ)を一貫して用いた。Perkin Elmer LS 50B 蛍光分光計を用いて蛍光スペクトルを得た。Hp 9090a Peltier Temperature Controller を具備したHP 8453ダイオードアレイ分光光度計を用いて融解分析を実施した。Eppendorf 5415遠心機またはBeckman Avanti 30遠心機を用いて遠心を行った。200kVで操作する日立 HF-2000電界放出TEMを用いてTEM画像を得た。

【0284】

B. オリゴヌクレオチド-QD共役体の調製

半導体量子ドット(QD)の合成法は最近の数年間に大きく改良されており、ある種の材料、最も注目すべきことにはCdSeに関して、今や予備決定サイズの単分散試料を比較的容易に調製し得る。Murrayら, J. Am. Chem. Soc., 第115巻, 8706ページ, 1993年; Hinesら, J. Phys. Chem., 第100巻, 4686ページ, 1996年。その結果、QDを発光ダイオード(Schlampら, J. Appl. Phys., 第82巻, 5837ページ, 1997年; Dabbousiら, Appl. Phys. Lett., 第66巻, 1316ページ, 1995年)および非放射生物学的標識(Bruchezら, Science, 第281巻, 2013ページ, 1998年; Chanら, Science, 第281巻, 2016ページ, 1998年)などの多様なテクノロジーに用いるための道を開く可能性があるこれらの粒子の固有の電子特性および蛍光特性が広範囲に研究されている(Alivisatos, J., Phys

. Chem., 第100巻, 13226ページ, 1996年、およびその中の参考文献: Kleinら, Nature, 699, 1997年; Kunoら, J. Chem. Phys., 第106巻, 9869ページ, 1997年; Nirmalら, Nature, 第383巻, 802ページ, 1996年参照)。しかし、多くの用途では、これらの粒子は表面上に空間的に配列されるか、または三次元物質中に組織化されることが要求されるであろう (Vossmeierら, J. Appl. Phys., 第84巻, 3664ページ, 1998年)。さらに、1種以上のナノ粒子を超格子構造 (Murrayら, Science, 第270巻, 1335ページ, 1995年) 中に組織化する能力があれば、新規かつ潜在的に興味深く有用な特性を有する完全に新しい種類のハイブリッド材料の構築が可能になるであろう。

【0285】

DNAは、ナノスケールの構築ブロック集合体を周期的な二次元および三次元拡張構造中にプログラムするための理想的なシントンである。合成し易さ、非常に高い結合特異性およびヌクレオチド配列による実質的に無制限のプログラム可能性を含むDNAの多くの特性をQD集合体の使用に利用し得る。

【0286】

DNAによるQDの修飾は、金ナノ粒子の場合よりも困難であることが証明された。高い蛍光CdSe QDを調製するための一般法によって、トリオクチルホスフィンオキシド (TOPO) とトリオクチルホスフィン (TOP) の混合物でコートされた材料が得られる。その結果、これらのQDは、非極性溶媒にのみ可溶になり、そのため、QDを高荷電DNA鎖で直接反応により官能化するのには難しい。この難点は、初めて半導体ナノ粒子を一本鎖DNAで修飾することに成功した以下に記載の方法により克服された。他の人々は、精密な研究において、QDと二本鎖DNAとの相互作用を考えていたが、これらの研究は、拡張QD構造の集合体を誘導するDNAの配列特異的結合特性を利用しなかったことに留意されたい。Cofferrら, Appl. Phys. Lett., 第69巻, 3851ページ, 1996年; Mahtabら, J. Am. Chem. Soc., 第114巻, 7028ページ, 1996年。

【0287】

CdSe/ZnSコア/シェルQDの表面は有機チオールと結合するので、これらの半導体粒子を、置換反応により、アルキルチオールを末端基とするDNA鎖で修飾することが望ましかった。しかし、これらのQDは水溶性ではないので、そのような方法は妨げられた。最近、QDを水溶性にして、QD表面上にタンパク質構造を固定化させるための2種の異なる方法が報告された。一方は、シリカ膜でコア/シェル構造を封入するステップを含み (Bruchezら, Science, 第281巻, 2013ページ, 1998年)、他方は、粒子を安定させ、かつ水溶性とするためにメルカプト酢酸を利用する (Chanら, Science, 第281巻, 2016ページ, 1998年)。DNAハイブリダイゼーション条件下に著しく安定したコロイドを生成する、この実施例に記載されている手順は、QD表面を不動態化するために3-メルカプトプロピオン酸を利用する。

【0288】

1. 0mlのN, N-ジメチルホルムアミド (DMF; オールドリッチ社) 中の (Hinesら, J. Phys. Chem., 第100巻, 468ページ, 1996年に記載のように調製した) ~20mgのTOP/TOP安定化CdSe/ZnS QDの懸濁液に、シリンジを用いて、過剰な3-メルカプトプロピオン酸 (0.10ml, 1.15mmol; オールドリッチ社) を添加して、3-メルカプトプロピオン酸官能化QDを含有する透明な黒みがかったオレンジ色の溶液を生成した。反応は急速に起こった。後続反応のために、過剰な3-メルカプトプロピオン酸を除去せず、粒子を室温下でDMF中に保存した。

【0289】

しかし、QDの特性決定のために、試料の一部から反応しなかった3-メルカプトプロピオン酸を以下のように除去して精製した。0.50ml試料を (30,000rpmで4

10

20

30

40

50

時間) 遠心し、上清を除去した。残りの溶液を $\sim 0.3 \text{ ml}$ のDMFで洗浄し、再遠心した。このステップをさらに2回繰り返してから、FTIRスペクトルを記録した。FTIR (ポリエチレンカード、3M社): 1710 cm^{-1} (s)、 1472 cm^{-1} (m)、 1278 cm^{-1} (w)、 1189 cm^{-1} (m)、 1045 cm^{-1} (w)、 993 cm^{-1} (m)、 946 cm^{-1} (w)、 776 cm^{-1} (m)、 671 cm^{-1} (m)。TOP/TOPO安定化天然QDとは異なり、3-メルカプトプロピオン酸修飾QDは、表面結合プロピオン酸に特徴的な 1710 cm^{-1} の $\nu_{\text{C=O}}$ バンドを示した。

[0290]

3-メルカプトプロピオン酸修飾QDは水に実質的に不溶であるが、それらの溶解度は、以下のパラグラフに記載のように、表面結合メルカプトプロピオン酸部位を4-(ジメチルアミノ)ピリジン(DMAP; オールドリッチ社)で脱保護して有意に高めることができた。そうすると、QDは水に容易に分散し、オレンジ色の溶液となり、この溶液は室温下に1週間まで安定であった。

[0291]

オリゴヌクレオチドをQDに付着させるために、DMF中の3-メルカプトプロピオン酸官能化粒子溶液 $150 \mu\text{l}$ (530 nm での光学密度 $=21.4$)を、 0.4 ml のDMF中のDMAP (8.0 mg 、 0.065 mmol)の溶液に添加した。オレンジ色の沈殿物が形成された。これを、遠心 ($3,000 \text{ rpm}$ で ~ 30 秒)により分離し、次いで、3'-プロピルチオールまたは5'-ヘキシルチオールを末端基とするオリゴヌクレオチド ($1.0 \sim 2.0 \text{ OD/ml}$; 実施例1に記載のように調製; 配列は以下に記載)の溶液 1.0 ml に溶解させた。(水に溶解した)沈殿物をIRスペクトロスコーピー (ポリエチレンカード、3M社)によって特性決定した。IR (cm^{-1}): 1647 (m)、 1559 (s)、 1462 (m)、 1214 (w)、 719 (w)、 478 (s)。12時間放置した後、オリゴヌクレオチド含有溶液を 0.15 M NaClに加え、粒子をさらに12時間成熟させた。次いで、NaClの濃度を 0.3 M に高め、混合物をさらに24~40時間放置してから、 100 kDa メンブレン (Spectra/Por Cellulose Ester Membrane)を用いてPBS (0.3 M NaCl、 10 mM リン酸緩衝液、 $\text{pH } 7$ 、 0.01% アジ化ナトリウム)で透析した。透析は48時間にわたって実施し、その間に、透析浴を3回新しくした。

[0292]

このようにして調製したオリゴヌクレオチド-QD共役体は、不定な水安定性を示した。さらに、コロイドは、($\sim 3.2 \text{ nm}$ CdSeコアを示す; Murray, J. Am. Chem. Soc., 第115巻, 8706ページ, 1993年) 546 nm での急激な[半値全幅 (FWHM) $= 33 \text{ nm}$] 対称発光を有し、強力に蛍光性のままであった。

[0293]

このプロトコルにより、2種の異なるオリゴヌクレオチド-QD共役体を調製し、PBS中に保存した。一方は、3'末端のプロピルチオール官能基と、12mer捕獲配列と、介在10塩基 (すべてA) スペーサー: $5' - \text{TCTCAACTCGTAA}_{10} - (\text{CH}_2)_3 - \text{SH}$ [配列番号46]とからなる22merで修飾した。他方は、5'-ヘキシルチオールを末端基とする配列と、さらに10塩基 (すべてA) スペーサー、および3'-プロピルチオール配列とは非相補的な12mer捕獲配列: $5' - \text{SH} - (\text{CH}_2)_6 - \text{A}_{10} \text{CGCATTCAGGAT} - 3'$ [配列番号47]を用いた。

[0294]

C. QD集合体の調製

ほぼ等量のこれら2種のオリゴヌクレオチド (それぞれ、 $200 \mu\text{l}$ 、 $\text{OD}_{530} = 0.224$ および 0.206)を混合し、次いで、相補的な連結24mer配列 ($5' - \text{TACGAGTTTGAGAAATCCT} - \text{GAATGCG} - 3'$ 、配列番号48)の溶液 $6 \mu\text{l}$ (60 pmol)と合わせて、室温下に20~30分以内でQD集合体を形成した (図26)。混合物を凍結 (-78°C)し、ゆっくり室温まで温めると、連結が速く起こった。

[0295]

10

20

30

40

50

生成したクラスターは、溶液から沈殿するほど大きくはなかった。しかし、クラスターは、連結しなかった粒子 (30, 000 rpm で 2~3 時間) と比べて、比較的低速で過心 (10, 000 rpm で 10 分間) することにより分離することができた。

【0296】

ハイブリダイゼーション直後の蛍光の減少を、4 対の試料の 475 nm から 625 nm までの蛍光シグナル (励起波長 320 nm) の積分により定量した。各対は以下の方法で調製した。Eppendorf 遠心管中で、3' プロピルチオールを末端基とする DNA で修飾した粒子 (30 μ l、530 nm での光学密度 = 0.224) の溶液を、5' ヘキシルチオールを末端基とする DNA で修飾した QD (30 μ l、530 nm での光学密度 = 0.206) と合わせ、次いで 140 μ l の PBS で希釈した。次いで、混合物を 2 つの等量部分に分け、一方には相補的「リンカー」DNA (3 μ l、30 pmol) を、他方には、非相補的「リンカー」DNA (5' -CTACTTAGATCCGAGTGCACAT-3'、配列番号 49) (3 μ l、30 pmol) を加えた。次いで、全 8 種の試料をドライアイス/アセトン浴 (-78°C) 中で凍結し、その後、試料を溶から取り出し、ゆっくり室温まで温めた。ハイブリダイゼーション時の蛍光効率の変化を予測するために、「標的」(相補的「リンカー」) 試料の蛍光強度を、非相補的「リンカー」を含む対応する対照試料由来の 320 nm での吸光度における差を明らかにするように調整した。

【0297】

結果は、QD/QD 集合体が、平均して 26.4 \pm 6.1% の積分蛍光強度の減少と、QD 間の協同事象によると考えられる発光最大の ~2 nm のレッドシフトを伴うことを示した。興味深いことには、Bawendi らは、密集 QD と凍結マトリックス中で広く分離している隔離ドットの蛍光を比較したときに、類似ではあるが、わずかに大きなレッドシフトに気づいていた (Murray ら, Science, 第 270 巻, 1335 ページ, 1995 年)。蛍光スペクトルにおけるこれらの変化は、QD 間にエキシマが形成されたことを示しているのかもしれないが、そのような複合体の正確な性質は、大部分まだ類推の域を出ないものである。予測したように、「リンカー」が無いが、もしくは相補的でない場合、または 2 種の粒子のどちらかが不在の場合に、凝集は観察されなかった。

【0298】

温度の関数として凝集体の UV-可視スペクトルを観察して、DNA の「融解」挙動をモニターした。この「融解」分析のために、QD/QD 集合体を含む沈殿物を 10, 000 rpm で 10 分間遠心し、7 μ l の PBS で洗浄、再遠心して、0.7 ml の PBS に懸濁させた。温度を 25°C から 75°C まで上昇させながら、各測定の前に 1 分間の保持時間をとって、集合体の UV/可視分光シグナチャーを 2°C 間隔で記録した。実験を通じて均一性を確実にするために、混合物を 500 rpm の速度で攪拌した。次いで、600 nm での消光から温度対消光プロファイルを作製した。これらのプロファイルの一次導関数を用いて「融解」温度を決定した。

【0299】

結果、図 27B ($T_m = 57^\circ\text{C}$) は、DNA が QD 表面上に固定化され、ハイブリダイゼーションが集合体プロセスに関与することを明確に証明した。DNA だけと比較したときの偏移は極めて急激 (それぞれの一次導関数の FWHM: 4°C 対 9°C) であり、これは、1 粒子当たり多重 DNA 結合を有する凝集体構造の形成と一致する。変性により消光の増大が観察されたが、これは、集合体内の粒子がその周囲の QD による光の吸収から防止されるスクリーニング効果のためである可能性が高い。

【0300】

D. QD/金集合体の調製

DNA 官能化 QD が得られたので、多重種類のナノ粒子構築ブロックから作製したハイブリッド集合体の構成が実現可能になった。これらのハイブリッド集合体を作製するために、Eppendorf 遠心管中で、~17 nM の 3' -ヘキシルチオールで修飾した 13 nm の金ナノ粒子 (30 μ l、~5 fmol) ; 実施例 3 に記載のように調製の溶液を、

5'-ヘキシルチオールを末端基とするDNA修飾QD (15 μ l、530 nmでの光学密度は0.206)と混合した。「リンカー」DNA (5 μ l、50 pmol)を加え、混合物を-78℃に冷却し、次いで、ゆっくり室温まで温めると、赤みを帯びた紫色の沈殿物が生成した。両種類の粒子と相補的標的の不在下には、凝集挙動は観察されなかった。遠心 (3,000 rpmで1分間)し、上清を除去した後、沈殿物を100 μ lのPBSで洗浄し、再遠心した。

【0301】

「融解」分析のために、洗浄した沈殿物を0.7 mlのPBSに懸濁した。UV-可視分光法を用いて、金ナノ粒子の表面プラズモン共鳴の変化を追跡して、525 nmでの温度依存性プラズモン共鳴を測定した。金ナノ粒子の表面プラズモン共鳴を用いると、ハイブリダイゼーションをモニターするために、QDだけのUV-可視分光シグナチャーを用いるよりも、はるかに高感度のプローブが得られる。したがって、「融解」実験は、はるかに小さい試料 (QD溶液の~10%が必要) に関して実施し得るが、プラズモンバンドの強さによって、QD由来のUV/可視シグナルが不鮮明になる。上記の純粋QD系と同様に、急激な (一次導関数のFWHM=4.5℃) 融解転移は、58℃で起こった (図27D参照)。

【0302】

これらの集合体の高解像度TEM画像は、多重QDにより相互連絡された金ナノ粒子網目構造を示した (図27C)。TEM画像では金ナノ粒子よりはるかにコントラストが弱いQDは、それらの格子干渉縞によって識別し得る。QDは、高解像度TEMでかなり解像できるが、これらの複合体集合体の周期的構造やそれらの形成にDNAが果たす役割を明瞭に示している。

【0303】

E. 要約

この実施例に記載されている結果は、QD表面へのDNAの固定化が達成され、かつ今やこれらの粒子をハイブリダイゼーション条件下にDNAと組合せて使用し得ることを最も確実に立証している。DNA官能化QDを用いて、最初のDNA誘導QD形成および混合金/QDナノ粒子構造が実証された。半導体QDをDNAで首尾良く修飾することは、材料研究にとって重要な意味を有しており、これらの固有の構築ブロックは新規かつ機能的な多成分ナノ構造およびナノスケール材料に組み込まれるので、今や、これらのブロックの蛍光、電子、および化学特性の広範囲な研究への扉が開かれている。

【0304】

実施例18： オリゴヌクレオチドナノ粒子共役体の合成法およびそれらの方法により生成された共役体

A. 一般法

$\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ およびクエン酸三ナトリウムは、ウィスコンシン州ミルウォーキー所在のオールドリッチ・ケミカル社 (Aldrich Chemical Company, Milwaukee, WI) から購入した。純度99.999%の金ワイヤ、およびチタンワイヤは、イリノイ州エバンストン所在のゴールドスミス社 (Goldsmith Inc., Evanston, IL) から購入した。厚さ1ミクロンの酸化物質層を有するシリコンウェーハ (100) は、カリフォルニア州サンタクララ所在のシリコン・クエスト・インターナショナル社 (Silicon Quest International, Santa Clara, CA) から購入した。5'-チオール修飾剤C6-ホスホロアミダイト試薬、3'-プロピルチオール修飾剤CPG、フルオレセインホスホロアミダイト、およびオリゴヌクレオチド合成に必要な他の試薬は、ヴァージニア州スターリング所在のグレン・リサーチ社から購入した。すべてのオリゴヌクレオチドは、標準ホスホロアミダイト化学 (Eckstein, F., Oligonucleotides and Analogues; 第1版; Oxford University Press, New York, 1991年) を用いるDNA自動合成機 (エキスパイテ社 (Expedite)) を使って調製した。5'-ヘキシルチオール修飾体のみを含むオリゴヌク

10

20

30

40

50

レオチドを実施例1に記載のように調製した。5'（および6'）-カルボキシフルオレイン、スクシンイミジルエステルは、オレゴン州ユーージン所在のモレキュラー・プロベス社（Molecular Probes, Eugene, OR）から購入した。NAP-5カラム（Sephadex G-25 Medium, DNAグレード）は、ファルマシア・バイオテック社（Pharmacia Biotech）から購入した。すべての実験に、Barnstead NANOpure超純水系を用いて精製したナノビュアH₂O（>18.0 MΩ）を用いた。Auナノ粒子溶液の遠心には、Eppendorf 5415CまたはBeckman Avanti 30遠心機を用いた。高速液体クロマトグラフィーは、HPシリーズ1100 HPLCを用いて実施した。

【0305】

B. 物理測定

オリゴヌクレオチドおよびナノ粒子溶液の電子吸収スペクトルは、Hewlett-Packard (HP) 8452aダイオードアレイ分光光度計を用いて記録した。蛍光分光法は、Perkin-Elmer LS50蛍光光度計を用いて実施した。透過型電子顕微鏡検査（TEM）は、200 kVで操作する日立8100透過型電子顕微鏡で実施した。ナノ粒子溶液中の金の原子濃度の定量には、誘導結合プラズマ（ICP）源を備えたAtomScan25原子分光計を用いた（金の発光は242.795 nmでモニターした）。

【0306】

C. 蛍光標識したアルカンチオール修飾オリゴヌクレオチドの合成および精製 5'ヘキシルチオール部分および3'フルオレsein部分を用いて、12塩基を含むチオール修飾オリゴヌクレオチド鎖を調製した。12mer (S12F) の配列は、HS(CH₂)₆-5-CGC-ATT-CAG-GAT-3'-(CH₂)₆-F【配列番号50】であり、32mer (SA₂₀12F) は同じ12mer配列とさらになる20dAスベラー配列を5'端に有していた【配列番号51】。チオール修飾オリゴヌクレオチドは、Storhoffら, J. Am. Chem. Soc., 第120巻: 1959-1964ページ（1998年）に記載のように調製した。自動合成にはアミノ修飾剤C7 CPG固相支持体を用い、5'末端は、先に記載のように、ヘキシルチオールホスホアミダイトで手で修飾した。3'アミノ、5'トリチルで保護したチオール修飾オリゴヌクレオチドを、254 nmでDNAのUVシグナルをモニターしながら、0.03 M トリエチルアンモニウムアセテート（TEAA）、pH7および1%/分勾配の95% CH₃CN/5% 0.03 M TEAAを含むHP ODS Hypersilカラム（5mm、250×4mm）を用いて、1ml/分の流速で逆相HPLCにより精製した。5'-トリチル、3'アミノ修飾12塩基および32塩基オリゴヌクレオチドの保持時間はそれぞれ36分、32分であった。

【0307】

凍結乾燥産物を1mlの0.1 M Na₂CO₃に再分散させ、調製業者の指示（モレキュラー・プロベス社の文献）に従って、暗所で攪拌しながら、無水DMF中10 mg/mlのフルオレseinスクシンイミジルエステル（5, 6 FAM-SE、モレキュラー・プロベス社）100 μlを1.5時間かけて加えた。溶液を室温下にさらに15時間攪拌し、次いで、-20℃下に100%エタノールから沈殿させた。沈殿物を遠心して回収し、H₂Oに溶解させ、イオン交換HPLCにより、結合産物を反応しなかったアミノを末端基とするオリゴヌクレオチドから分離した。10 mM NaOH水性溶液および1%/分勾配の1 M NaCl/10 mM NaOHを用いて、0.8 ml/分の流速で、Dionex Nucleopak PA-100カラム（250×4 mm）を操作した。5'-トリチル、3'フルオレsein修飾12merおよび32merの保持時間はそれぞれ50分、49分であった。オリゴヌクレオチド産物を逆相HPLCで脱塩した。フルオレseinを末端基とするトリチルオリゴヌクレオチドのトリチル保護基の除去は、先に記載のように、（Storhoffら, J. Am. Chem. Soc., 第120巻, 1959-1964（1998年））、硝酸銀およびジチオトレイトール（DTT）を

10

20

30

40

50

用いて行った。オリゴヌクレオチドの収率および純度は、アルキルチオールオリゴヌクレオチドに関して先に記載した技術 (Storhoffら, J. Am. Chem. Soc., 第120巻: 1959-1964ページ (1998年)) を用いて評価した。オリゴヌクレオチドは、チオール基のトリチル除去処理直後に使用した。

【0308】

3' がプロピルチオールで5' フルオレsein部分 ($\text{HS}(\text{CH}_2)_3-3'-(\text{W})_{20}-\text{TAG}-\text{GAC}-\text{TAA}-\text{CGC}-5'-(\text{CH}_2)_6-\text{F}$, $\text{W}=\text{A}$ または T) である32塩基を含むチオール修飾オリゴヌクレオチド [配列番号52] を、3' チオール修飾剤CPGを使用して自動合成装置で合成した。各オリゴヌクレオチドの5' 末端を、手作業で、フルオレseinホスホロアミダイト (6-FAM (6-FAM, Glen Research Inc.)) につなげた。修飾オリゴヌクレオチドを、イオン交換HPLCで精製した (1M NaClの1% / 分勾配, 10mM NaOH; 保持時間 (R_t) ~ 4.8 分 ($\text{W}=\text{T}$), $R_t \sim 2.9$ 分 ($\text{W}=\text{A}$))。精製後、オリゴヌクレオチド溶液を逆相HPLCで脱塩した。3' チオール部分を、以前に記載された方法 (Storhoffら, J. Am. Chem. Soc. 120: 1959-1964 (1998)) により、ジチオスレイトールで脱保護した。

【0309】

D. フルオレsein標識オリゴヌクレオチドの合成および精製

発蛍光団標識相補体 (12' F) は、S12FおよびSA2012Fの12mer配列と相補的な12塩基3' -GCG-TAA-GTC-CTA-5' - $(\text{CH}_2)_6-\text{F}$ [配列番号53] から構成した。標準法を用いてオリゴヌクレオチドを合成し、5' アルキルチオール修飾に関して上述した手順に類似のシンジベース手順を用いて、フルオレseinホスホロアミダイト (6-FAM, Glen Research社) とCPG連結オリゴヌクレオチドの5' 末端とをカップリングした。上記のような逆相HPLCを用いて精製を実施した。フルオレsein標識オリゴヌクレオチドの保持時間は18分であった。自動合成機用のアミノ修飾剤C7 CPG固相支持体を用いて発蛍光団標識相補体、3' 12F (5' -ATC-CTG-CAAT-GC-G-F; [配列番号54]) を調製し、次いで、上記手順を用いて、5-(6)-カルボキシフルオレseinスクシンイミジルエステルを3' アミンにカップリングした。

【0310】

E. 金ナノ粒子の調製および特性決定

金ナノ粒子は、実施例1に記載のように、 HAuCl_4 をクエン酸塩で還元して調製した。得られたナノ粒子のサイズ分布の定量には、日立8100TEMを用いて実施する透過型電子顕微鏡検査 (TEM) を用いた。グラフィックソフトウェア (Image Tool) を用いてTEMネガから少なくとも250粒子を分粒した。典型的な粒子配合物の平均直径は 15.7 ± 1.2 nmであった。球状ナノ粒子と密度がバルク金の密度 (19.30 g/cm^3) と等しいと仮定して、粒子当たりの平均分子量を計算した ($2.4 \times 10^7 \text{ g/mol}$)。金ナノ粒子溶液中の金原子の濃度を、ICP-AES (誘導結合プラズマ原子発光分光法) によって決定した。校正には、金原子吸着標準溶液 (オールドリッチ社) を用いた。粒子溶液中の金原子濃度とTEM分析によって得た平均粒子質量とを比較して、所与の配合物中の金粒子のモル濃度、典型的には $\sim 10 \text{ nM}$ を得た。表面プラズモン周波数 (520 nm) でのナノ粒子溶液のUV-可視吸光度を測定して、粒子のモル消光係数 (520 nm での ϵ) を計算すると、典型的には、直径 $15.7 \pm 1.2 \text{ nm}$ の粒子では $4.2 \times 10^8 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ であった。

【0311】

F. 金薄膜の調製

シリコンウェーハを $\sim 10 \text{ mm} \times 6 \text{ mm}$ 部片に切断し、 50°C 下にピラニア腐蝕溶液 (4:1の濃 H_2SO_4 :30% H_2O_2) で30分洗浄し、次いで、多量の水、次いでエタノールでリンスした。(警告: ピラニア腐蝕溶液は有機物質と激しく反応するので、取り扱いには厳重な注意が必要である。) Edwards FTM6石英結晶微量天秤を具備

10

20

30

40

50

した Edwards Auto 306 エバポレータ (3×10^{-7} ミリバールの基準圧力) を用いて 0.2 nm/秒 の速度で金属を蒸着させた。シリコンの酸化された側面を、 5 nm の Ti 接着層、次いで 200 nm の金でコートした。

【0312】

G. 5' アルキルチオールオリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子の調製

新たに脱保護したオリゴヌクレオチドをナノ粒子水溶液 (粒子濃度 $\sim 10 \text{ nM}$) に $3 \mu\text{M}$ の最終オリゴヌクレオチド濃度まで加えて、金ナノ粒子をフルオレsein-アルキルチオールオリゴヌクレオチドで修飾した。24 時間後、溶液を $\text{pH } 7$ (0.01 M リン酸) で緩衝し、 NaCl 溶液を (0.1 M の最終濃度まで) 加えた。これらの条件下にさらに 40 時間、溶液を「熟成」させた。次いで、 $14,000 \text{ rpm}$ で 30 分間遠心して、過剰な試薬を除去した。上清を除去した後、赤色の油性沈殿物を、 0.3 M NaCl 、 10 mM リン酸緩衝液、 $\text{pH } 7$ (PBS) で 2 回洗浄し、連続遠心して、再分散させ、最後に新鮮な緩衝液中に再分散させた。洗浄手順中、常に、少量 (UV-可視分光法により測定して $\sim 10\%$) のナノ粒子が上清と共に廃棄される。したがって、最終ナノ粒子濃度を、TEM、ICP-AES、および UV-可視分光法 (上記参照) で測定した。消光係数および粒度分布は、オリゴヌクレオチド修飾の結果として有意には変化しなかった。

【0313】

H. 5' アルキルチオールオリゴヌクレオチド修飾金薄膜の調製

シリコン支持金薄膜を、金ナノ粒子の場合と同じ回数および同じ緩衝条件下に、脱保護したアルキルチオール修飾オリゴヌクレオチドの蒸着溶液中に浸漬した。オリゴヌクレオチド蒸着の後、膜を 0.3 M PBS でよくリンスし、緩衝液中に保存した。不動化されていないケイ素/酸化ケイ素面を残して、片面の金のみを蒸発させた。しかし、アルキルチオール修飾 DNA は、PBS に浸漬した何も結合していない酸化ケイ素表面には有意に吸着しなかった。

【0314】

I. ナノ粒子上に充填したアルキルチオールオリゴヌクレオチドの定量

オリゴヌクレオチドを置換するために、 0.3 M PBS 中の発蛍光団標識オリゴヌクレオチドで修飾したナノ粒子または薄膜に、メルカプトエタノール (ME) を (12 mM の最終濃度まで) 添加した。間欠的に振とうしながら、室温下に 18 時間後、金ナノ粒子を遠心するか、または金薄膜を除去して、置換オリゴヌクレオチドを含有する溶液を金から分離した。 0.3 M PBS 、 $\text{pH } 7$ を添加して、上清のアリコート を 2 倍希釈した。試料および校正標準溶液の pH とイオン強度を、これらの条件に対するフルオレsein の光学的性質の感度によるすべての測定値に関して、同じに維持するように注意した (Zhao, Spectrochimica Acta, 45A: 1113-1116 ページ (1989 年))。 (520 nm で測定した) 最大蛍光を、標準線形校正曲線からの補間によりフルオレsein-アルキルチオール修飾オリゴヌクレオチドのモル濃度に換算した。標準曲線は、同一の緩衝液および塩濃度を用いて発蛍光団標識オリゴヌクレオチドの既知濃度を用いて作製した。最後に、測定したオリゴヌクレオチドのモル濃度を元の金ナノ粒子濃度で割って、粒子当たりの平均オリゴヌクレオチド数を得た。次いで、ナノ粒子溶液中の (球状粒子を想定して) 予測した粒子表面積で割って、正規表面被覆面積値を計算した。真円度の仮定条件は、計算した 0.93 の平均真円度に基づく。真円度因数は、Baxes, Gregory, Digital Image Processing, 157 ページ (1994 年) から引用した ($4 \times \pi \times \text{面積}$) (周長 $\times 2$) として計算する。

【0315】

J. ハイブリダイズされた標的表面密度の定量

付着したオリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーション活性を測定するために、蛍光発色団で標識したオリゴヌクレオチド (表面結合オリゴヌクレオチド ($12' \text{ F}$) に相補的) を、ハイブリダイゼーション条件 ($3 \mu\text{M}$ 相補的オリゴヌクレオチド、 0.3 M PBS 、 $\text{pH } 7$ 、24 時間) 下で、オリゴヌクレオチド修飾表面 (金のナノ粒子または薄膜) と反応させた。ハイブリダイズしなかったオリゴヌクレオチドは、上述したように緩衝塩

10

20

30

40

50

溶液で2度リンスすることにより金から取り外した。その後、蛍光発色図で標識したオリゴヌクレオチドを、NaOHの添加（最終濃度 ~ 50 mM、pH 11 ~ 12 、4時間）により、デハイブリダイズした。遠心によってナノ粒子溶液から12' F含有溶液を分離した後、1M HClの追加によって溶液を中和し、ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチドの濃度とそれに対応するハイブリダイズされた標的の表面密度を、蛍光分光法により測定した。

【0316】

K. 表面被覆面積の定量とハイブリダイゼーション

クエン酸塩安定化金ナノ粒子を12merフルオレsein修飾アルキルチオールDNA ($\text{HS}-(\text{CH}_2)_6-5'-\text{CGC}-\text{ATT}-\text{CAG}-\text{GAT}-(\text{CH}_2)_4-\text{F}$ 【配列番号50】)で官能化した。次いで、化学吸着していないオリゴヌクレオチドを完全に洗い流した後で、発蛍光団標識オリゴヌクレオチドを金表面から除去して表面被覆面積研究を実施し、(上記のような)蛍光分光法を用いてオリゴヌクレオチド濃度を定量した。

【0317】

金表面からすべてのオリゴヌクレオチドを除去し、次いで溶液から金ナノ粒子を除去すること、いくつかの理由で、蛍光による正確な被覆面積データを得るために重要である。第1に、標識した表面結合DNAの蛍光シグナルは、金ナノ粒子への蛍光共鳴エネルギー移動(FRET)の結果として効率的に消光される。実際、フルオレsein修飾オリゴヌクレオチド(12 ~ 32 ヌクレオチド鎖、配列は上記に記載)が15.7 ± 1.2 nmの金ナノ粒子上に固定化され、溶液中の残留オリゴヌクレオチドが洗い流された後は、フルオレsein修飾オリゴヌクレオチドに関して測定可能なシグナルはほとんど存在しない。第2に、金ナノ粒子は、200 ~ 530 nmの間に有意な量の光を吸収し、のために、蛍光測定時の溶液中の金ナノ粒子の存在は、フィルターとしての役割を果たし、利用可能な励起エネルギーだけでなく放出される放射線の強度をも低下させる。フルオレseinの最大放出時には、520 nmでの金表面プラズモンバンドが減少する。

【0318】

メルカプトエタノール(ME)を用いて、交換反応により表面結合オリゴヌクレオチドを急速に置換させた。置換動力学を調べるために、遠心および蛍光測定の前、オリゴヌクレオチド修飾ナノ粒子を、増加時間、ME(12 mM)に暴露した。ナノ粒子を含まない溶液に関連する蛍光の強さを用いて、ナノ粒子からどの位多くのオリゴヌクレオチドが放出されるかを測定することができる。MEと交換に放出されたオリゴヌクレオチドの量は、約10時間の暴露まで増大した(図29)が、これは、完全なオリゴヌクレオチドの置換を示している。置換反応は高速であり、これは、オリゴヌクレオチド膜がMEの金表面へのアクセスをブロックし得ないためであると考えられる(Biebuyckら, Langmuir, 第9巻, 1766ページ(1993年))。

【0319】

金ナノ粒子上のアルキルチオール修飾12merオリゴヌクレオチド(S12F)の平均オリゴヌクレオチド表面被覆面積は、34 ± 1 pmol/cm²(試料の10回の個別測定値の平均)であった。直径15.7 ± 1.2 nmの粒子の場合、これは、金粒子1個当たりおよそ159チオール結合12mer鎖に相当する。パッチ毎に粒径はわずかに異なるものの、面積が正規化された表面被覆面積は、異なるナノ粒子配合物に関して類似していた。

【0320】

この方法が正確なオリゴヌクレオチド表面被覆面積を得るために有用であることを確認するために、金薄膜から発蛍光団標識オリゴヌクレオチドを置換する方法を用い、表面被覆面積データと類似の情報を得ることを目的とするが異なる技術を用いた実験と比較した。これらの実験では、金薄膜に対し、クエン酸塩安定化金ナノ粒子(上記参照)と類似のオリゴヌクレオチド修飾およびME置換手順を課した。金薄膜のオリゴヌクレオチド置換対時間曲線は、金ナノ粒子に関して測定したものと極めて類似している。これは、これらの薄膜に関して測定した典型的な表面被覆面積値が金ナノ粒子上のオリゴヌクレオチド被覆

10

20

30

40

50

面積よりいくらか低かったにも拘わらず、薄膜の置換速度は類似していることを示唆している。本発明者らの技術によって測定した金薄膜上のオリゴヌクレオチド表面被覆面積 ($18 \pm 3 \text{ pmol/cm}^2$) が、既に報告されたオリゴヌクレオチド薄膜上の被覆面積の範囲内 (電気化学または表面プラズモン共鳴分光法 (SPRS) を用いて測定された金電極上の 25 塩基オリゴヌクレオチドに関しては 10 pmol/cm^2 (Steelら, Anal. Chem., 第 70 巻, 4670-4677 ページ (1998 年)) に含まれることは重要である。表面被覆面積の相違は、オリゴヌクレオチドの配列と長さの違いおよび薄膜の調整方法の違いによるものと考えられる。

【0321】

表面結合 12mer オリゴヌクレオチドを備えたナノ粒子への相補的な蛍光発色団標識されたオリゴヌクレオチド ($12' \text{ F}$) のハイブリダイゼーションの範囲を、上述のように測定した。簡潔に説明すると、 $S12 \text{ F}$ 修飾ナノ粒子を、 $12 \text{ F}'$ に $3 \mu \text{M}$ の濃度でハイブリダイゼーション条件 (0.3 M PBS 、 $\text{pH} 7$) 下で 24 時間暴露し、次に、緩衝液で入念にリンスした。やはり、蛍光測定前に金からハイブリダイズした鎖を取り外すことが必要であった。これは、高 pH 溶液 (NaOH 、 $\text{pH} 11$) 中で二重鎖 DNA を変性させてから遠心にかけてにより遂行した。ハイブリダイズした $12' \text{ F}$ は、総計 $1.3 \pm 0.2 \text{ pmol/cm}^2$ (15.7 nm 粒子当たり約 6 つの二本鎖；1 粒子当たりの二本鎖の平均数は、正規化したハイブリダイズされた表面被覆範囲 (pmol/cm^2) に、TEM によって測定した粒度分布から求められる平均粒子表面積を掛けることにより算出した。) に達した。非特異性吸着の程度を測定するために、 $S12 \text{ F}$ 修飾ナノ粒子を、 0.3 M PBS 中で、蛍光発色団標識した非相補的な 12 塩基オリゴヌクレオチド ($12 \text{ F}'$) に暴露した。入念にリンス (連続する遠心/再分散ステップ) とそれに続く高 pH 処理後、ナノ粒子上の非特異的に吸着したオリゴヌクレオチドの被覆範囲は約 0.1 pmol/cm^2 であるとわかった。金電極に関する報告値とハイブリダイゼーション結果を比較するために、類似の方法を使用して、 $S12 \text{ F}$ 修飾金薄膜へのハイブリダイゼーションを測定した。ハイブリダイゼーション $6 + 2 \text{ pmol/cm}^2$ の程度は、金電極上の混合塩基 25mer に対して報告されているハイブリダイゼーション ($2-6 \text{ pmol/cm}^2$) (Steelら, Anal. Chem. 70: 4670-4677 (1998)) と一致していた。

【0322】

ナノ粒子用システムおよび薄膜の両方に対する $S12 \text{ F} / 12 \text{ F}'$ 系の表面被覆範囲およびハイブリダイゼーション値を、表 7 に要約する。最も顕著な結果は、ハイブリダイゼーション効率の低さである (ナノ粒子上の表面結合鎖の 4 % 未満、薄膜上の鎖の 33 % がハイブリダイズ)。以前の研究では、十分に密に充填されたオリゴヌクレオチド単分子層に対して、同様に低いハイブリダイゼーションが示されていた。これは、塩基の立体的密集性の組合せ (特に金表面付近の) と静電気反発相互作用とにより、入って来るハイブリダイズ鎖への接近容易性が低いことを反映している可能性がある。

【0323】

1. 表面被覆範囲とハイブリダイゼーションに対するオリゴヌクレオチドスパーサーの影響

$S12 \text{ F}$ オリゴヌクレオチドの適用範囲が高いことは、ナノ粒子安定化の点から有利であるが、その低いハイブリダイゼーション効率により、本願発明者らは、ハイブリダイズする配列の周囲の立体的混雑を減少させる手段を考案するように促された。アルキルチオール基と最初の 12 塩基認識配列との間に 20 dA スパーサー配列が挿入された、オリゴヌクレオチド (32mer) を合成した。このストラテジーを、以下の 2 つの仮定に基づき選択した。すなわち、1) ナノ粒子表面付近の塩基は、含窒素塩基と金表面間の相互作用の弱さと、鎖間の立体密集との故に、立体的に接近不能であること、および、2) 直径 15.7 nm の概ね球状の粒子では、概ねその表面に対して垂直な 20mer スパーサーユニットの端部に付着された 12mer 配列 (Levickyら, J. Am. Chem. Soc. 120: 9787-9792 (1998)) は、表面に直接結び付けられた同じ 1

10

20

30

40

50

2merから形成されたフィルムに比べてより大きな自由体積を有するフィルムにつながるだろう。

【0324】

一本鎖 $\text{SA}_{20}12\text{F}$ 鎖の表面密度($15 \pm 4 \text{ pmol/cm}^2$)は $\text{S}12\text{F}$ (34 の $\pm 1 \text{ pmol/cm}^2$)よりも低い、同一の表面修飾を使用して 32mer で修飾した粒子は、 12mer で修飾した粒子と比較して、かなりの安定性 w_p を示した。予想されたように、 $\text{SA}_{20}12\text{F}/12\text{F}'$ 系のハイブリダイゼーション効率($6.6 \pm 0.2 \text{ pmol/cm}^2$, 44%)は、元の $\text{S}12\text{F}/12\text{F}'$ 系のハイブリダイゼーション効率の約10倍に増大した(表7)。

【0325】

M. オリゴヌクレオチド付着時の電解質濃度の効果

$\text{S}12\text{F}$ 配列を用いた研究において、塩熱成ステップが、安定したオリゴヌクレオチド修飾ナノ粒子を得るのに重要であることが判明した(実施例3参照)。純水中 $\text{S}12\text{F}$ で修飾した金ナノ粒子を不可逆的に融解し、遠心すると、黒色沈殿物が形成されたが、塩中で熱成させたものは、高イオン強度溶液中で遠心しても凝集しなかった。安定性の増大は、立体保護作用および静電保護作用をもたらす高いオリゴヌクレオチド表面被覆面積によるものと考えられる。 $\text{SA}_{20}12\text{F}$ 修飾粒子を用いて、オリゴヌクレオチド表面添加に及ぼす電解質条件の効果を調べた。図8に示すように、 $5'$ ヘキシルチオールおよび $3'$ フルオレsein部分を有するチオール修飾オリゴヌクレオチドを調製し、上記のように金ナノ粒子に付着させ、ナノ粒子上のこれらのオリゴヌクレオチドの表面被覆面積を上記のように定量した。結果は以下の表7に示されている。水中のオリゴヌクレオチドに48時間暴露した金ナノ粒子の最終表面被覆面積は、塩で「熱成」されるか、または実験の最後の24時間にわたって漸進的に塩濃度を増大させて(最終濃度は 1.0 M NaCl)調製したものと比べると、はるかに低かった($7.9 \pm 0.2 \text{ pmol/cm}^2$) (上記参照)。

【0326】

合成された金ナノ粒子は、極めて低いイオン強度媒質中でさえ不可逆的に凝集することは注目に値する。確かに、金ナノ粒子は本来、塩、特にオリゴヌクレオチドなどのポリアニオンには不相容である。安定したオリゴヌクレオチド粒子を調製するためには、この熱成処理が必須である。したがって、粒子は、イオン強度を徐々に増大させる前に、先ず、水中のアルキルチオールオリゴヌクレオチドで修飾しなければならない。オリゴヌクレオチドは、初期には、窒素含有塩基と金との弱い相互作用を介して結合した状態で平らに横たわっていると思われる。類似の相互作用モードが薄膜に付けたオリゴヌクレオチドに関して提案されている(Herneら, J. Am. Chem. Soc., 第119巻, 8916-8920ページ(1997年))。しかし、オリゴヌクレオチドと正に帯電したナノ粒子表面との相互作用は、さらに強力であると予想される(Weitzler, Surf. Sci., 第158巻, 147-164ページ(1985年))。熱成ステップにおいて、高イオン強度媒質は、隣接するオリゴヌクレオチド間の電荷反発だけでなくポリアニオンオリゴヌクレオチドと正に帯電した金表面との間の引力をも効率的に遮蔽する。これにより、より多くのオリゴヌクレオチドがナノ粒子表面に結合し、それによってオリゴヌクレオチド表面被覆面積が増大する。

【0327】

N. 表面被覆範囲に対するオリゴヌクレオチドスパーサー配列の影響

スパーサーの配列がどのようにAuナノ粒子上のオリゴヌクレオチドの被覆範囲に影響するかを調べるために、 $3'$ プロピルチオールとフルオレsein標識 12mer 配列の間に 20d スパーサーおよび 20dT スパーサーが挿入されたフルオレsein修飾 32mer 鎖を、調製した。 $\text{S}3'T_{20}12\text{F}$ と $\text{S}3'A_{20}12\text{F}$ で修飾したナノ粒子に関する表面被覆範囲とハイブリダイゼーションの研究で最も顕著な結果は、 20d スパーサー($24 \pm 1 \text{ pmol/cm}^2$)と比較して、 20dT スパーサー($35 \pm 1 \text{ pmol/cm}^2$)でより大きな表面被覆範囲が達成されたことである。ハイブリダイズした表面結

10

20

30

40

50

合鎖のパーセンテージは $SA_{2012mer}$ ナノ粒子 (79%) では SA_{2012} ナノ粒子 (「 $\sim 94\%$ 」より低かったが、ハイブリダイズした鎖の数は匹敵していた。これらの結果は、 dT 豊富なオリゴヌクレオチド鎖が、 dA 豊富なオリゴヌクレオチドよりも低い程度でナノ粒子表面と非特異的に相互作用することを示唆している。従って、 $20dA$ スペーサーセグメントが粒子表面上で平坦に横渡ることにより金の部位をブロックする一方、 $20dT$ スペーサーセグメントは、金の表面から垂直に延びることができ、これはより高い表面被覆範囲を促す。

【0328】

0. 同時吸着された希釈剤オリゴヌクレオチドの影響

効率的なハイブリダイゼーションに加えて、オリゴヌクレオチド修飾ナノ粒子の別の重要な特性は、ハイブリダイゼーション事象の総数を調節する可能性である。これは、認識鎖の表面密度の調節により最も容易に遂行される。他の研究者は、ハイブリダイゼーションを制御するために、金電極上の修飾オリゴヌクレオチドと共に、メルカプトヘキサノールのような同時吸着される希釈剤アルキルチオールを使用した (Steelら, Anal. Chem. 70: 4670-4677 (1998); Herneら, J. Am. Chem. Soc. 119: 8916-8920 (1997))。しかしながら、保護されていない金ナノ粒子の固有の低い安定性は、希釈剤分子の選択に重大な制約を提起した。チオール修飾 $20dA$ 配列 (SA_{20}) [配列番号 55] は、ハイブリダイゼーションに必要な高いイオン強度の緩衝液中での粒子安定性を維持し、かつ非特異的吸着から表面を保護する点で、適切していることがわかった。

【0329】

ナノ粒子を、種々の認識鎖 (SA_{2012F}) 対希釈剤 (SA_{20}) 鎖の分子比を有する溶液を用いて修飾した。得られた粒子を、 SA_{2012F} 表面密度の測定のために上述の蛍光方法で分析し、次に、 $12'F$ とのハイブリダイゼーション効率に関してテストした。

【0330】

SA_{2012F} 表面密度は、堆積溶液中の SA_{2012F} 対 SA_{20} の比率に関して直線的に増加した (図30)。これは、ナノ粒子に付けられた SA_{2012F} と SA_{20} の比が溶液の比を反映することを示唆しているので、面白い結果である。この結果は、溶解度と鎖長が吸着動力学に重大な役割を果たす、短鎖アルキルまたはT官能化チオールの混合物に通常見られる結果と対照的である (Bainら, J. Am. Chem. Soc. 111: 7155-7164 (1989); Bainら, J. Am. Chem. Soc. 111: 7164-7175 (1989))。

【0331】

個々の異なるサンプルにハイブリダイズした相補的な $12F$ オリゴヌクレオチドの量も、 SA_{2012F} 表面被覆範囲の増加につれて直線的に増加した (図31)。この関係が良好に定義されるという事実は、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体のハイブリダイゼーションの程度を予測および制御できることを示す。これは $12F'$ のハイブリダイゼーションがより高い SA_{2012F} 被覆範囲ではより困難になり、オリゴヌクレオチド間に立体的密集と静電気反発が起こる可能性が高いことを示唆している。

【0332】

P. 要約

本研究は、オリゴヌクレオチドを付着させたナノ粒子を安定化させる程度に高いが、高い割合の鎖が溶液中のオリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションのために接近できる程度に低く、オリゴヌクレオチド被覆範囲間のバランスを達成することが重要であることを示している。それは、オリゴヌクレオチドを、高いオリゴヌクレオチド表面被覆範囲を得るためにナノ粒子に付着させたり、静電相互作用を減らすためにオリゴヌクレオチドスペーサーセグメントに付着させたり、各ナノ粒子に対するハイブリダイゼーション事象の平均数を再現可能に制御するために同時吸着鎖を付着したりしている間に、塩条件を調節させることにより達成される。鎖 (スペーサー) の配列の性質が、金ナノ粒子に装填され

たオリゴヌクレオチド鎖の数に影響を及ぼすことも示された。この研究は、オリゴヌクレオチドとナノ粒子の間の相互作用の理解ならびにナノ粒子ーオリゴヌクレオチド検出方法の感度の最良化に関して重要な意味合いを持つ。

【0333】

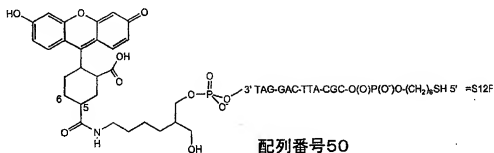
【表7】

表 7

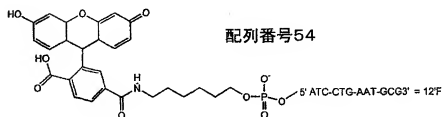
金薄膜と金ナノ粒子に対する一本鎖の表面被覆範囲とそれに対応するハイブリダイズされた表面被覆範囲。S12FとSA₂₀12Fの表面被覆範囲およびハイブリダイゼーションの比較。チオール修飾オリゴヌクレオチドを3μM水溶液から金に附着させ、0.1M NaClで熱成した。ハイブリダイゼーション試験はすべて0.3M PBS、pH7で行った。

オリゴヌクレオチド対	表面被覆範囲 (pmol/cm ²)	ハイブリダイゼー ション被覆範囲 (pmol/cm ²)	ハイブリダイゼー ション効率 (%)
Auナノ粒子			
S12F/12F [*]	34 ± 1	1.3 ± 0.2	-4%
SA ₂₀ 12F/12F [*]	15 ± 4	6.6 ± 0.2	-44%
Au薄膜			
S12F/12F [*]	18 ± 3	6 ± 2	-33%

【化1】



【化2】



【表8】

金ナノ粒子に対する S A₂₀ 1 2 F オリゴヌクレオチドの表面被覆範囲と 1 2 F' へのハイブリダイゼーションに対する塩による熱成の影響

アルキルチオール DNA	表面被覆範囲	ハイブリダイゼー	ハイブリダイゼー
吸着中の緩衝液条件		ション被覆範囲	ション効率
	(pmol/cm ²)	(pmol/cm ²)	(%)
H ₂ O	7.9 ± 0.2	—*	—
0.1M NaCl, 10mM リン酸	1.5 ± 0.4	6.6 ± 0.2	~4.4
1.0M NaCl, 10mM リン酸	2.0 ± 0.2	6.5 ± 0.2	~3.3

*上記実験に対する信頼できる値は、遠心後に起こった粒子の凝集体が少量であるために得られなかった。

【表 9】

表面被覆範囲とハイブリダイゼーション効率に対するオリゴヌクレオチドスベアサー配列の影響

オリゴヌクレオチド対	表面被覆範囲	ハイブリダイゼー	ハイブリダイゼー
		ション被覆範囲	ション効率
	(pmol/cm ²)	(pmol/cm ²)	(%)
S3'A ₂₀ 12F/3'12F'	2.4 ± 1	9 ± 2	~3.8
S3'T ₂₀ 12F/3'12F'	3.5 ± 1	1.2 ± 1	~3.4

S3'A₂₀12F/S3'T₂₀12F=HS(CH₂)₃-3'-W₂₀-TAG-GAC-TTA-CGC-5'-(CH₂)₆-F [配列番号 5 2]

3'12F=5'-ATC-CTG-AAT-GCG-F [配列番号 5 4]

実施例 19: 遺伝子チップアッセイ

この実施例では、オリゴヌクレオチド官能化金ナノ粒子を用いたコンビナトリアル DNA アレイの選択的が非常に高くかつ非常に高感度な分析法を説明する。非常に狭いナノ粒子一標の複合体熱解離温度範囲により、ヌクレオチド誤対合を 1 つ有する標的から所与のオリゴヌクレオチド配列を、非常に高い選択性で識別することができる。さらに、銀 (I) のナノ粒子触媒還元に基づくシグナル増幅法と組合せると、このナノ粒子配列検出系の感度は、慣用の類似発蛍光団系の感度よりも 2 桁の大きさだけ優れている。

【0334】

科学者が病気の遺伝的根拠を明らかにし、この新規な情報を医学診断や治療の改良に用いるにつれ、配列選択的 DNA 検出はますますその重要度を増している。サザンブロットやコンビナトリアル DNA チップなどの一般に用いられている異種 DNA 配列検出系は、標的 DNA と相補的な表面結合一本鎖オリゴヌクレオチドの特異的ハイブリダイゼーションに基づいている。これらのアッセイの特異性も感度も、全対合配列および誤対合配列にハイブリダイズした捕獲鎖の解離特性に依存する。以下に説明するように、驚くべきことには、基板にハイブリダイズした単 1 種類のナノ粒子が類似の発蛍光団ベース系や非標識 DNA よりも実質的に急激な融解プロファイルを示すことが発見された。さらに、ナノ粒子二本鎖の融解温度は、同一配列を有する類似の発蛍光団系の場合より 11℃ も高い。これら 2 つの観察結果を、銀 (I) のナノ粒子触媒還元に基づく定量的シグナル増幅法の開発と合わせると、1 単塩基誤対合選択性および類似の慣用発蛍光団ベースアッセイよりも 2

10

20

30

40

50

術も高い感度を有する新規なチップベースDNA検出系の開発が可能になる。

【0335】

3成分サンドイッチアッセイ形式(図32参照)において、透明な基板にハイブリダイズした特定のDNA配列の存在を示すために、実施例3に記載のように調製したオリゴヌクレオチドが付着している金ナノ粒子(直径13nm)を用いた。典型的な実験では、基板は、実施例10に記載のようなアミン修飾ブローブオリゴヌクレオチドを用いて、フロートガラス製顕微鏡スライド(フィッシャー・サイエンティフィック社)を官能化して作製した。この方法を用いて、スライドの表面全体に1種類のオリゴヌクレオチドまたは市販のマイクロアレイヤーを用いてスポットした複数種類のオリゴヌクレオチドアレイで官能化したスライドを作製した。次いで、指示オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子および(炭疽菌保護抗原配列をベースとする)合成30merオリゴヌクレオチド標的をこれらの基板に同時ハイブリダイズさせた(図32参照)。したがって、表面のナノ粒子の存在によって、特定の30塩基配列の検出が示された。標的濃度が高い(≥ 1 nm)と、表面上のハイブリダイズした高密度のナノ粒子が、表面を明るいピンク色にした(図33参照)。標的濃度が低い場合、付着しているナノ粒子は、(電界放出走査電子顕微鏡検査では画像が見られたが)肉眼で見ることができなかった。基板表面にハイブリダイズしたナノ粒子の視覚化を容易にするために、銀イオンをヒドロキノンによって触媒的に還元してスライド表面上に銀金属を形成するシグナル増幅法を用いた。この方法は、組織化学顕微鏡検査研究において、タンパク質-および抗体-結合金ナノ粒子を拡大するために用いられている(Hacker, Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications, M. A. Hayat編(Academic Press, San Diego, 1989年),第1巻,第10章;Zehner, Am. J. Pathol.,第150巻,1553ページ(1997年))が、その定量的DNAハイブリダイゼーションアッセイにおける使用は新規である(Tomlinson, Anal. Biochem.,第171巻,217ページ(1988年))。この方法は、ナノ粒子ブローブの極めて低い表面被覆面積を簡単な平台型スキャナや肉眼で視覚化し得た(図33)だけでなく、染色面積の光学密度に基づく標的ハイブリダイゼーションの定量も可能になった(図34)。重要なことには、標的の不在下、または非相補的標的の存在下には、表面の染色は観察されず、これは、ナノ粒子の表面への非特異的結合も、非特異的銀染色も起こらないことを証明している。この結果は、核酸の非常に高い感度かつ非常に選択的な検出を可能にするこれらのナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体の優れた特徴である。

【0336】

さらに、本発明のオリゴヌクレオチド官能化ナノ粒子の固有のハイブリダイゼーション特性を、さらにコンビナトリアルオリゴヌクレオチドアレイ(または「遺伝子チップ」)の選択性を改良するために用いることが確認された(Fodor, Science, 第277巻,393ページ(1997年))。オリゴヌクレオチドアレイの異なる素子にハイブリダイズした標的の相対比は、標的配列決定時のアレイの正確性を決定するであろう。この比率は、異なる捕獲鎖とDNA標的との間で形成された二本鎖のハイブリダイゼーション特性に依存する。驚くべきことには、これらのハイブリダイゼーション特性は、発蛍光団標識の代わりにナノ粒子標的を用いることにより劇的に改良される。図35に示されているように、ナノ粒子標識標的の表面結合捕獲鎖からのデハイブリダイゼーションは、同一配列を有する発蛍光団標識標的のものよりはるかに温度感受性である。発蛍光団標識標的は、極めて広範な温度範囲(一次導関数FWHM=16°C)にわたって表面捕獲鎖からデハイブリダイズしたが、同一ナノ粒子標識標的ははるかに急激に融解した(一次導関数FWHM=3°C)。これらの急勾配の解離プロファイルは、通常、ハイブリダイゼーションストリンジエンシー洗浄によって影響を受ける、チップベースの配列分析のストリンジエンシーを改善すると予想された。確かに、相補的表面ブローブにハイブリダイズした標的と、(図35の水平線によって表される)特定温度下のストリンジエンシー洗浄後に、誤対合ブローブにハイブリダイズした標的との比率は、発蛍光団標識よりナノ粒子標識の

10

20

30

40

50

方がはるかに高い。これは、チップ検出形式における高選択性を意味する筈である。さらに、ナノ粒子標識は、それによって、それより低いと、二本鎖が室温下で自発融解する臨界濃度を低下させる表面二本鎖の融解温度 (T_m) を上昇させることによりアレイ感度を向上させるであろう。

【0337】

オリゴヌクレオチドアレイの比色指示剤としてのナノ粒子の有効性を評価するために、テストチップを合成標的のプロンプ、発蛍光団指示剤とナノ粒子指示剤とで標識した。テストアレイとオリゴヌクレオチド標的は、公開されているプロトコル (Guo, *Nucleic Acids Res.*, 第22巻, 5456ページ (1994年); *Genetic Microsystems* 417 *Microarray* を用いて、 $3.75 \mu\text{m}$ で分離された直径 $1.75 \mu\text{m}$ のスポットアレイをパターン化した) に従って作製した。アレイは、標的の8位の4つの可能なヌクレオチド (N) それぞれに対応する4つの素子を含んでいた (図32参照)。ハイブリダイゼーション緩衝液中で、合成標的と、蛍光標識またはナノ粒子標識プローブとを段階的にアレイにハイブリダイズさせたが、各ステップの後で、 35°C のストリンジェンシー緩衝液洗浄を行った。まず、 $2 \times \text{PBS}$ (0.3M NaCl 、 $10 \text{mM Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 緩衝液、 $\text{pH} 7$) 中の 1nM 合成標的溶液 $20 \mu\text{l}$ とアレイとを、室温下に4時間、ハイブリダイゼーションチャンバ (Grace Bio-Labs Cover Well PC20) 中でハイブリダイズさせ、次いで、 35°C 下に清浄な $2 \times \text{PBS}$ 緩衝液で洗浄した。次いで、 $2 \times \text{PBS}$ 中 100pM オリゴヌクレオチド官能化金ナノ粒子溶液 $20 \mu\text{l}$ とアレイとを、室温下に4時間、新鮮なハイブリダイゼーションチャンバ中でハイブリダイズさせた。アレイを 35°C 下に清浄な $2 \times \text{PBS}$ で洗浄し、次いで、 $2 \times \text{PBS}$ (0.3M NaNO_3 、 $10 \text{mM Na}_2\text{H}_2\text{PO}_4 / \text{Na}_2\text{HPO}_4$ 緩衝液、 $\text{pH} 7$) で2回洗浄した。次いで、ナノ粒子アレイを銀増幅溶液 (シグマ・ケミカル社、Silver Enhancer Solution) 中に5分間浸漬し、水で洗浄した。銀増幅により、アレイ素子はかなり暗色化し、直径 $200 \mu\text{m}$ の素子は平台型スキャナまたは肉眼でさえ容易に見ることができた。

【0338】

モデル標的およびナノ粒子標識プローブで攻撃し、銀溶液で染色したアレイは、相補的アレイ素子への選択性の高いハイブリダイゼーションを明瞭に示した (図36A)。同じ捕獲配列の重複スポットは、再現性があるばらつきのないハイブリダイゼーションシグナルを示した。ナノ粒子または銀染料によるバックグラウンド吸着は全く観察されなかった。平台型スキャナによって記録された画像グレースケール値は、清浄な顕微鏡スライドに関して観察されたものと同じであった。8位のアデニン ($N=A$) に対応する暗いスポットは、オリゴヌクレオチド標的が、 $3:1$ を超える比率で、誤対合鎖よりも完全相補性捕獲鎖に選択的にハイブリダイズしたことを示している。さらに、各スポットセットの総合グレースケール値は、ワトソン・クリック型塩基対、 $A:T > G:T > C:T > T:T$ (Allawi, *Biochemistry*, 第36巻, 10581ページ (1988年)) の予測安定性に従う。通常、 $G:T$ 誤対合を $A:T$ 相補体から識別するのは特に難しく (Saiki, *Mutation Detection*, Cotton 編 (Oxford University Press, Oxford, 1998年), 第7章; Silkuta, *Nucleic Acids Res.*, 第15巻, 797ページ (1987年))、これら2種のアレイ素子の識別は、1つのヌクレオチド誤対合の検出におけるナノ粒子標識の驚異的な分解能を証明している。ナノ粒子ベースアレイの選択性は、発蛍光団指示アレイの選択性より高く (図36B)、発蛍光団標識は8位のアデニンに対して $2:1$ の選択性を提供したに過ぎない。

【0339】

ナノ粒子標識プローブを利用するアクセシビリティは、発蛍光団標識プローブを利用するものより感度が有意に高かった。ハイブリダイゼーションシグナルを、 50 fM 程度の低さ (または、 $20 \mu\text{l}$ の溶液を含有するハイブリダイゼーションチャンバの場合は、 1×10^{-6} 総

10

20

30

40

50

コピー数)の標的濃度の $N=A$ 要素で分解することができた。これは、通常、 1 pM 以上の標的濃度が要求される慣用の $Cy3/C75$ 発蛍光団標識アレイに比べて劇的な感度の向上を示している。表面上に固定化されたナノ粒子-標的複合体に関して観察された高融解温度がアレイの感度に寄与していることは疑いもない。ナノ粒子系の場合に発蛍光団系に比べてプローブ/標的/表面-オリゴヌクレオチド複合体の安定性が増大すると、洗浄ステップ中に失われる標的およびプローブが少なくなると考えられる。

【0340】

コンビナトリアルオリゴヌクレオチドアレイの比色性ナノ粒子標識は、誤対合1つの解像、感度、コスト、使用し易さが重要な要素であるヌクレオチド多型分析などの用途に有用であろう。さらに、全体的に最適化が必要があるこの系の感度は、ポリメラーゼ連鎖反応などの標的増幅計画を必要とせずに、オリゴヌクレオチド標的を検出するための潜在的方法を示している。

【0341】

実施例20: ナノ粒子構造

ハイブリダイズしたDNAリンカーを媒介としたガラス支持体上への超分子重層金ナノ粒子構造の可逆的集合体を説明する。オリゴヌクレオチド官能化ナノ粒子を、相補的DNAリンカーの存在下、オリゴヌクレオチド官能化ガラス支持体に連続付着させる。DNAの独特な認識特性により、相補的リンカーの存在下にナノ粒子構造が選択的に集合する。さらに、これらの構造は、溶液の温度、pH、およびイオン強度を含めた連結二本鎖DNAのハイブリダイゼーションを媒介する外部刺激にตอบสนองして集合したり、離散したりし得る。この系は、固相支持体上にナノ粒子ベース構造を構築する極めて選択的かつ制御された方法を提供することに加えて、DNAによって連結されたナノ粒子網目構造の光学特性と融解特性とに影響を与える要素の研究を可能にする。

【0342】

別者は、いかにして、二官能価有機分子(Gittinsら, Adv. Mater., 第11巻, 737ページ(1999年); Brustら, Langmuir, 第14巻: 5425ページ(1998年); Brightら, Langmuir, 第14巻: 5696ページ(1998年); Grabarら, J. Am. Chem. Soc., 第118巻: 1148ページ(1996年); Freemanら, Science, 第267巻: 1629ページ(1995年); Schmidら, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 第39巻: 181ページ(2000年); Marinakosら, Chem. Mater., 第10巻: 1214ページ(1998年))または高分子電解質(Storhoffら, J. Am. Chem. Soc., 第120巻, 1959ページ(1998年); Storhoffら, J. Cluster Sci., 第8巻: 179ページ(1997年); Elghanianら, Science, 第277巻: 1078ページ(1997年); Mirkinら, Nature 第382巻, 607ページ(1996年))を使用して平面構造から単層および多層ナノ粒子材料を制御可能に構築し得るかを証明した。ナノ粒子の相互連結体としてDNAを用いることの魅力的な特徴は、DNA配列を選択することにより、粒子間間隔、粒子周期性および粒子組成を合成的にプログラムし得ることである。さらに、オリゴヌクレオチドの可逆結合特性を利用して、動構造ではなく熱力学的構造を確実に形成し得る。この方法は、固相支持体からのナノ粒子ベース構造の成長を制御する新規かつ強力な方法を提供するだけでなく、ナノ粒子凝集体サイズと、凝集体DNA相互連結構造の融解特性および光学特性との関係を評価することもできる。これら2つの物理的パラメータとそれらの材料構築物との関係は、特にバイオ検出分野におけるナノ粒子網目構造材料の利用に必須である。

【0343】

多層集合体の構築に用いられる直径 13 nm のオリゴヌクレオチド官能化金ナノ粒子を実施例1および3に記載のように調製した。これらのナノ粒子には、それぞれナノ粒子aおよびbを生成する、 $5'-\text{ヘキシルチオール-キヤップオリゴヌクレオチド}1(5'-\text{HSC(CH}_2)_6\text{O(PO}_2^-)\text{O-CGCATTTCAGGAT-3'})$ [配列番号50]と

10

20

30

40

50

、3'-プロパンチオールキヤップオリゴヌクレオチド2 (3'-HS(CH₂)₃O (PO₂⁻)O-ATGCTCAACTCT-5' [配列番号59] が付着していた(図37参照)。実施例10に記載のように、ガラス製スライドを12merオリゴヌクレオチド2で官能化した。ナノ粒子層を構築するために、まず、基板を24merリンカー3 (5'-TACGAGTTGAGAATCCTGAATGCG-3' [配列番号60]) の10nM溶液に浸漬し、室温下に4時間ハイブリダイズさせた(図37参照)。支持体を清浄な緩衝液で洗浄し、次いで、第1ナノ粒子層を付着させるために室温下に4時間、粒子aの2nM溶液とハイブリダイズさせた。同様に基板表面をリンカー3とナノ粒子bの溶液に暴露するだけで第2ナノ粒子層を第1ナノ粒子層に付着させることができた。これらのハイブリダイゼーションステップを繰り返して、各層がリンカー3を介して前の層に連結したナノ粒子aとbの多重交互層を付着させることができた。リンカーの不在下、または非相補的オリゴヌクレオチドの存在下では、表面へのナノ粒子のハイブリダイゼーションは観察されなかった。さらに、DNAリンカーのハイブリダイゼーションを促進させる条件：中性pH、穏和な塩濃度(>0.05M NaCl)および二本鎖融解温度(T_m)を下回る温度下にてのみ多層集合体が観察された。

【0344】

ハイブリダイズした各ナノ粒子層は、基板をより暗紅色とし、10層がハイブリダイズした後の支持ガラス製スライドには、反射による金色が出現した。表面へのナノ粒子の連続ハイブリダイゼーションのモニターには、基板の透過UV-可視分光法を用いた(図38A)。初期ナノ粒子層の吸光度の低さは、この層がさらなる層の形成を促進するものとなったことを示唆しており、層を追加するに従って、プラズモンバンドの強度がほぼ線形に増大することが示された(各連続ナノ粒子層の形成に関して、リンカー3またはナノ粒子溶液の暴露時間を長くしたり、濃度を増大させたりしても、さらなる吸光度の増大は観察されなかった)。初期ナノ粒子層生成後に吸光度が線形に増大したことは、連続的に層を加えるに従って、表面がハイブリダイズしたナノ粒子で飽和されたことを示している(図38B)。これは、1層の場合には低いナノ粒子被覆を示すが、2層の場合にはほぼ完全な被覆を示す表面上の1つ(図39A)および2つ(図39B)のナノ粒子層の電界放出走査型電子顕微鏡(FE-SEM)画像によって支持される。多層集合体のプラズモンバンド λ_{max} は、5層になった後でさえ、10nm以下しかシフトしない。このシフトの検出は、金ナノ粒子凝集体の他の実験的処理(Grabbar, J. Am. Chem. Soc., 第118巻, 1148ページ(1996年))および理論的処理(Quinten, Surf. Sci., 第172巻, 557ページ(1996年))とYangら, J. Chem. Phys., 第103巻, 869ページ(1995年))と一致する。しかし、シフトの大きさは、 $\lambda_{max} > 570\text{nm}$ を示す、オリゴヌクレオチドに連結した金ナノ粒子網目構造の懸濁液に関して先に観察されたものと比較すると小さい(先の実施例参照)。これは、金ナノ粒子ベースのオリゴヌクレオチドプローブに関して観察された赤色から青色への劇的な変色を生成するには、恐らく何百または何千ものもつと多くのナノ粒子が連結する必要があることを示唆している。(Storhoffら, J. Am. Chem. Soc., 第120巻, 1959ページ(1998年))；Storhoffら, J. Cluster Sci., 第8巻, 179ページ(1997年)；Elghanianら, Science, 第277巻, 1078ページ(1997年)；Mirkinら, Nature, 第382巻, 607ページ(1996年))。凝集した金ナノ粒子の表面プラズモンシフトは、粒子間間隔に大きく依存することが明らかにされた(Quinten, Surf. Sci., 第172巻, 557ページ(1986年))；Storhoffら, J. Am. Chem. Soc., 前掲)。オリゴヌクレオチドリンカーにより提供される大きな間隔(この系の場合8.2nm)によって、金表面プラズモンバンドに及ぼすナノ粒子凝集の累積的效果が有意に低下する。

【0345】

集合したナノ粒子多層の解離特性は、層の数に大きく依存していた。多層でコートされた基板を緩衝液に懸濁し、温度を連結オリゴヌクレオチドのT_mより高い温度(53℃)に

10

20

30

40

50

上げると、ナノ粒子は、無色のガラス表面を残して、溶液中に解離した。緩衝懸濁液の pH を上下させたり (>11 または <3)、塩濃度を低下させたり (0.01M NaCl 未満) しても、連結した DNA をデハイブリダイズすることによりナノ粒子は解離した。多層集合体は完全に可逆性であり、ナノ粒子は、ガラス基板にハイブリダイズしたり、ガラス基板からデハイブリダイズしたりし得る (例えば、3つのサイクルは、検出可能な不可逆性ナノ粒子結合がないことが示された)。

【0346】

重要なことには、表面結合ナノ粒子集合体はすべて連結オリゴヌクレオチドの T_m を超える温度で解離したが、これらの転移の急激さは、支持されている凝集体のサイズに依存していた (図 39D-F)。驚くべきことには、支持体からの第 1 ナノ粒子層の解離は、溶液中にナノ粒子を含まない同じオリゴヌクレオチド (図 39C) のものより急激な転移 (図 39D、一次導関数の FWHM = 5°C) を示した。基板にさらにナノ粒子層がハイブリダイズするにつれ、オリゴヌクレオチド連結ナノ粒子の融解転移は、溶液中に見出された大きなナノ粒子網目構造集合体の融解転移と同等になるまで連続的に急激さを増した (図 39E-F、一次導関数の FWHM = 3°C)。 (Gittinsら, Adv. Mater., 第 11 巻: 737 ページ (1999 年); Brustら, Langmuir, 第 14 巻: 5425 ページ (1998 年)。) これらの実験は、最適な急激融解曲線を得るためには、3つ以上のナノ粒子と多重 DNA の相互連結体が必要であることを立証している。これらの実験はさらに、この系における光学的变化が融解特性から完全に切り離されている (すなわち、凝集が小さいと、急激な転移は生じ得るが、それでも変色は生じない) ことを示している。

【0347】

実施例 21: 金ナノ粒子集合体の電気的性質

DNA を介した電子的移動は、過去数年にわたり化学の分野で最も広範囲に討議されている問題の 1 つである。 (Kelleyら, Science, 第 283 巻: 375-381 ページ (1999 年); Turroら, J. B. C., 第 3 巻: 201-209 ページ (1998 年); Lewisら, J. B. C., 第 3 巻: 215-221 ページ (1998 年); Ratner, M., Nature, 第 397 巻: 480-481 ページ (1999 年); Okahataら, J. Am. Chem. Soc., 第 120 巻: 6165-6166 ページ (1998 年))。DNA は効率的に電子を移動させ得ると主張するものもいるが、DNA は絶縁体であると考えられるものもある。

【0348】

表面上類似点の無い研究分野において、ナノ粒子をベースとした材料の電気的性質の研究に多大な努力が傾けられてきた (Terrillら, J. Am. Chem. Soc., 第 117 巻: 12537-12548 ページ (1995 年); Brustら, Adv. Mater., 第 7 巻: 795-797 ページ (1995 年); Bethellら, J. Electroanal. Chem., 第 409 巻: 137-143 ページ (1996 年); Musickら, Chem. Mater., 第 9 巻: 1499-1501 ページ (1997 年); Brustら, Langmuir, 第 14 巻: 5425-5429 ページ (1998 年); Collierら, Science, 第 277 巻: 1978-1981 ページ (1997 年))。確かに、多くのグループがナノ粒子を二次元および三次元網目構造に集合させる方法を探究し、そのような構造の電子特性を調査してきた。しかし、DNA と連結させたナノ粒子ベース材料の電気的性質については実質的に何も分っていない。

【0349】

この研究において初めて、異なる長さの DNA 相互連結体によって形成された金ナノ粒子集合体の電気的性質が調査された。以下に示されているように、これらのハイブリッド無機集合体は、 $2.4 \sim 7.2$ ヌクレオチド範囲にわたるオリゴヌクレオチド粒子相互連結体長にも拘わらず、半導体として挙動する。本明細書に記載されている結果は、DNA 相互共役体が、金属ナノ粒子間の絶縁バリアを形成不要で、このため粒子の電気的性質を破壊することのない、金属ナノ粒子用の化学的に特異的な足場材料として用い得ることを示して

いる。これらの結果は、そのようなハイブリッド集合体を電子材料として利用し得る新規な方法を示している。

【0350】

この主題の中心には以下の問題がある：DNAを介して集合したナノ粒子は、それでも電気を伝導し得るか、または各粒子上に重度に添加されたDNA相互共役体は絶縁シエルとして作用し得るか、ということである (Mucic, R. C., Synthetically Programmable Nanoparticle Assembly Using DNA, Thesis Ph. D., Northwestern University (1999年))。これらの材料の導電率を、温度、オリゴヌクレオチド長および相対湿度の関数として調べた。DNAによって連結されたナノ粒子構造を、電界放出走査型電子顕微鏡検査 (FE-SEM)、シンクロトロン小角X線散乱 (SAXS, synchrotron small angle x-ray scattering) 実験、熱変性プロファイル、およびUV-可視分光法によって特性決定した。

【0351】

典型的な実験 (図40参照) では、クエン酸塩で安定化した13nm金ナノ粒子を、実施例1および3に記載のように、3' および5' アルカンチオールでキャップした12merオリゴヌクレオチド1 (3' SH(CH₂)₂O(PO₂⁻)O-ATGCTCAACTCT5' [配列番号59]) および2 (5' SH(CH₂)₆O(PO₂⁻)O-CGCAATTCAGGAT3' [配列番号50]) で修飾した。24、48または72塩基長のDNA鎖3 (5' TACGAGTTGAGAAATCCTGAATGCG3' [配列番号60])、4 (5' TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGAGGCAATC-ATGCAATCCTGAATGCG3' [配列番号61])、および5 (5' TACGAGTTGAGACCGTTAAGACGAGGCAATCATGCATATATTGACGCTTTACGGACAACATCCTGAATGCG3' [配列番号62]) をリンカーとして用いた。充填剤6 (3' GGCAATTTCTGCTCCGTTAGCT5' [配列番号63]) および7 (3' GGCAATTTCTGCTCCGTTAGCTATATAAACCCTGCGAAATGCCTGTTG5' [配列番号64]) を48塩基リンカーおよび72塩基リンカーと共に用いた。DNA修飾ナノ粒子とDNAリンカーおよび充填剤は、使用前に、0.3M NaCl、10mM リン酸 (pH7) 緩衝液 (0.3M PBSと称される) 中に貯蔵した。ナノ粒子集合体を構築するために、1で修飾した金ナノ粒子 (652 μl、9.7 nM) と2で修飾した金ナノ粒子 (652 μl、9.7 μM) をリンカーDNA3、4、または5 (30 μl、10 nM) に加えた。完全に沈殿させた後、凝集体を0.3M CH₃COONH₄ 溶液で洗浄して過剰なDNAおよびNaClを除去した。

【0352】

凝集体を凍結乾燥 (10⁻³ ~ 10⁻² トル) 乾固してペレットを得、揮発性塩CH₃COONH₄を除去した。Frens法 (Frens, Nature Phys. Sci., 第241巻: 20-22ページ (1973年)) により調製した官能化されていないクエン酸塩安定化粒子を膜として乾燥させ、比較用に用いた。得られた乾燥凝集体は、黄銅に似た色を有しており、非常に脆かった。FE-SEM画像は、オリゴヌクレオチド修飾ナノ粒子は乾燥しても無傷のままであるが、クエン酸塩安定化ナノ粒子は互いに融合したことを示した。乾燥したDNAを介して連結された凝集体が0.3M PBS緩衝液 (1ml) に再分散し得、かつ優れた融解特性を示したことは重要である。そのような分散液を60℃に加熱すると、DNA相互共役体のハイブリダイゼーションが起こり、分散したナノ粒子の赤色溶液が得られた。これをFE-SEMデータと含めると、DNA修飾金ナノ粒子は、乾燥させると、不可逆的には凝集しないことが最終的に証明された。

【0353】

コンピュータ制御4プローブ技術を用いて、3種の試料 (それぞれ3、4および5を介して連結された乾燥凝集体) の導電率を測定した。電気接点は、金ペーストでペレットに付着させた細い金ワイヤ (直径25および60 μm) から構成した。試料を中程度の真空 (

10

20

30

40

50

$10^{-3} \sim 10^{-2}$ トル) 下に冷却し、低圧のドライヘリウムガス下に温度を増大させながら導電率を測定した。起こり得る光電子事象を排除するために、試料チャンバを光から隔離した。励起電流を 100 nA 以下に維持し、試料全体にわたる圧力を最大 20 V に制限した。驚くべきことには、3種すべてのリンカーから形成された凝集体の導電率は、室温下に $10^{-5} \sim 10^{-4} \text{ S/cm}$ の範囲であり、これらの凝集体は、類似した温度依存性挙動を示した。DNA 連結凝集体の導電率は、半導体材料の特徴を示す、約 190° K までのアレニウス挙動を示した。これは、不連続金属島状態に認められる活性化電子ホッピング挙動に似ている (Barwinski, Thin Solid Films, 第 128 巻: 1-9 ページ (1985 年))。アルカンジチオールを介して連結された金ナノ粒子の網目構造は類似の温度依存性を示した (Brust, Adv. Mater., 第 7 巻: 795-797 ページ (1995 年); Bethell, J. Electroanal. Chem., 第 409 巻: 137-143 ページ (1996 年))。電荷移動の活性化エネルギーは、方程式 (1)

[0354]

$$\sigma = \sigma_0 \exp[-E_a/kT] \quad (1)$$

を用いる $\ln \sigma$ 対 $1/T$ のプロットから得ることができる。3つの測定値から計算した平均活性化エネルギーは、それぞれ 24 、 48 および 72 mer リンカーに関して、 $7.4 \pm 0.2 \text{ meV}$ 、 $7.5 \pm 0.3 \text{ meV}$ 、 $7.6 \pm 0.4 \text{ meV}$ であった。これらの計算には、 50° K から 150° K までの導電率を用いた。

[0355]

これらの種類の材料の電気的性質は粒子間間隔に依存する筈なので、シンクロトロン SAXS 実験を用いて、分散した乾燥凝集体の粒子間間隔を測定した。SAXS 実験は、Advanced Proton Source、Argonne National Laboratory の Dupont-Northwestern-Dow Collaborative Access Team (DND-CAT) Sector 5 で実施した。DNA 連結凝集体および DNA 修飾コロイドの希釈物試料を、 3 M クロムビームの 1.54 \AA 放射線で照射し、散乱放射線を CCD 検出器で回収した。2D データを循環的に平均し、散乱ベクトル量、 $s = 2 \sin(\theta)/\lambda$ (ここで、 2θ は散乱角、 λ は入射放射線の波長) の関数、 $I(s)$ に変換した。すべてのデータをバックグラウンド散乱および試料吸収に対して補正した。3種すべての凝集体構造を乾燥させると、粒子間間隔感受性の第 1 ピーク位置は、それぞれ、 24 mer 、 48 mer および 72 mer 連結凝集体の 0.063 nm^{-1} 、 0.048 nm^{-1} 、および 0.037 nm^{-1} の s 値から 0.087 nm^{-1} の s 値へ大きく変化した。これは、乾燥させると、粒子が殆ど接触するポイントまで粒子間間隔が有意に減少したこと、およびそのような間隔は実質的にはリンカー長とは無関係であるが、溶液中での粒子間隔はリンカー長に大きく依存していたことを示している。これによって、乾燥ペレットの導電率実験における 3 種の異なる系に関して何故類似の活性化エネルギーが観察されたかが分る。さらに、これによって、何故、DNA の電子特性の見方とは無関係に比較的高い導電率が観察されたかも明らかになる。DNA 連結材料とは異なり、乾燥させたクエン酸塩安定化金ナノ粒子膜は、金属様挙動を示した。これは、そのような粒子が互いに融合することを示した SEM データと一致する。

[0356]

190° K を超えると、測定した DNA 連結試料の導電率は非常に急な低下挙動を示した。すべての試料について、導電率は約 190° K で急激に低下し始め、およそ 250° K まで低下し続け、そこから再度増大した。この挙動を詳細に調査するために、試料を繰返し冷却、加熱しながら導電率を測定した。興味深いことには、導電率の低下は、温度が増大方向にあるときにのみ起こった。DNA は親水性であり、かつ水は潜在的にハイブリッド構造の電気的性質に影響を与え得るので、金属凝集体の導電率に及ぼす相対湿度の影響を調べた。湿度を 1% から 10% に増大させると、抵抗が 10 因子増大した。導電率測定前に、試料を真空 (10^{-6} トル) 下に 48 時間維持したときには、特有な急低下が非常に弱かったことに留意されたい。これらの観察結果から、 190° K を超えたときの導電率

の非常に急な低下およびその後の増大は、粒子間間隔を（蒸発が起こるまで）一時的に増大させた水の融解およびDNAの吸湿性に関連すると推断した。この仮説と一致して、0.3 M PBS緩衝液で濡らせた乾燥凝集体に関するSAXS測定値は、粒子間間隔の200%の増大（ ~ 2 nm）を示した。

【0357】

これらの研究は以下の理由から重要である。まず、これらの研究は、DNAの分子認識特性を用いれば、ナノ粒子ベース材料を、不動態化したり、それらの離散構造または電気的性質を破壊せずに集合させ得ることを証明している。これらのDNA官能化粒子を用いて三次元巨視的集合体または、さらにリトグラフィパターン化構造（Piner, Science, 第283巻: 661-663 (1999年)）における電気的移動を研究しようとする場合、それらの電気的移動特性を正確に叙述することが絶対に必要である。第2に、これらの研究は、かなり長いリンカー間隔（8 \sim 24 nm）にわたって、乾燥凝集体の導電率がDNAリンカー長には実質的に無関係であることを示している。これは、これらの実験において、水を除去したり、揮発性塩を用いたりした結果であると考えられる。確かに、溶媒および塩の除去によって創出された自由体積によって、DNAが表面に圧縮され、凝集体内の粒子が近接する。第3に、DNA保護ナノ粒子を有する凝集体は半導体として挙動するが、クエン酸塩安定化粒子から形成された膜は、不可逆的粒子融合および金属様挙動を示す。最後に、これらの結果は、オリゴヌクレオチドで官能化されたナノ粒子と標的DNAとの間の配列特異的結合事象が回路の閉鎖および導電率の急激な増大（すなわち、絶縁体から半導体へ）を起こすDNA診断用途におけるこれらの材料の使用を示している（次ぎの実施例参照）。

【0358】

実施例22：金電極を用いた核酸の検出

金電極を用いた核酸検出法が図39に略図で示されている。Guoら, Nucleic Acids Res., 第22巻, 5456-5465ページ（1994年）の方法に従って、2つの金電極の間のガラス表面を、標的DNA3（5' TACGAGTTGAGATCTCTGAATGCG [配列番号60]）と相補的な12merオリゴヌクレオチド1（3' NH₂ (CH₂)₇ O (PO₂⁻) O-ATG-CTC-AAC-TCT [配列番号59]）で修飾した。オリゴヌクレオチド2（5' SH (CH₂)₆ O (PO₂⁻) O-CGC-ATT-CAG-GAT [配列番号50]）を作製し、実施例1および18に記載のように13 nm金ナノ粒子に付着させて、ナノ粒子aを生成した。標的DNA3とナノ粒子aをデバイスに付加した。ガラス表面の色はピンク色に変わったが、これは、標的DNA-金ナノ粒子集合体がガラス基板上に形成されたことを示している。次いで、デバイスを0.3 M NaCl、10 mM リン酸緩衝液中に浸漬し、40℃で1時間加熱して、非特異的に結合したDNAを除去し、次いで、実施例19に記載のような銀染色溶液で5分間処理した。電極の抵抗は67 kΩであった。

【0359】

比較のために、電極間に、オリゴヌクレオチド1の代わりにオリゴヌクレオチド4を付着させて対照デバイスを修飾した。オリゴヌクレオチド4は、ナノ粒子上のオリゴヌクレオチド2と同じ配列（5' NH₂ (CH₂)₆ O (PO₂⁻) O-CGC-ATT-CAG-GAT [配列番号50]）を有しており、ナノ粒子の結合を阻止するように標的DNA3に結合するであろう。その他の点では上記のようにテストを実施した。抵抗は、使用したマルチメーターの検出限度である40 MΩより高かった。

【0360】

この実験は、相補的標的DNA鎖のみがデバイスの2つの電極間にナノ粒子集合体を形成し、回路は、ナノ粒子のハイブリダイゼーションおよびその後の銀染色によって完成し得ることを示している。したがって、相補的DNAおよび非相補的DNAは、導電率を測定することにより識別し得る。この形式は、何千もの異なる核酸を同時にテストし得る何千対もの電極を用いた基板アレイ（チップ）にも適用範囲を広げ得る。

【0361】

10

20

30

40

50

実施例 23：環式ジスルフィドリンカーを用いたオリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子の調製

この実施例では、調製が簡単で、広く有用で、メルカプトヘキシルリンカーを使用して調製した金-オリゴヌクレオチド共役体よりも DTT に対して大きな安定性を示す金-オリゴヌクレオチド共役体を与える、ステロイドジスルフィド 1a (図 42) に基づく金表面にオリゴヌクレオチドを結合させる新しい環式ジスルフィドリンカーについて説明する。

1, 2-ジチアン-4, 5-ジオールのエステル誘導体は金表面上で単分子層を形成することが知られているため (Nuzzo ら, J. Am. Chem. Soc. 105, 4481-4483)、環式ジスルフィドを、アンカーユニットの反応部位として選択した。環式ジスルフィドは、両方の硫黄原子を介して立とうに表面に結合し (Ullman, A., MRS Bulletin, 6月46-51)、向上した安定性を示し得るキレート構造を与えるだろう。リンク要素としては、入手が容易で、容易に誘導退化されるケトアルコールであり、大きな疎水性表面を備えた置換体として、金の表面への水溶性分子の接近を選別するのに役立つよう期待されるため、エピアンドロステロンを選択した (Rettinger ら, J. Am. Chem. Soc. 115, 7535-7536-Bioconjugate Chem. 9, 826-830)。

【0362】

先の研究に使用していたオリゴヌクレオチド-金プローブを、水性緩衝液中で末端メルカプトヘキシル基を有するオリゴヌクレオチドを金ナノ粒子と反応させることによって調製した。該プローブは、驚くほど丈夫で、100℃まで加熱した後や5℃で3年間保存した後でさえ良好に機能することが分かった。しかしながら、本願発明者らは、この共役体が、金の表面から誘導体化したオリゴヌクレオチドを取り外すことで作用するチオールを含む溶液に浸漬させた時に、ハイブリダイゼーションプローブとしての活性を失うことを見出した。この特徴は、ナノ粒子プローブが、チオールを含む溶液 (例えばポリメラーゼ酵素の安定化剤としてジチオスレイトール (DTT) を含む PCR 溶液) 中で使用される場合に、問題を提起する。

【0363】

(a) 一般法

NMR スペクトルを、溶媒として CDCl_3 、内部 (H) 標準として TMS、外部 (^{31}P) 標準として H_3PO_4 を使用して、500 MHz (^1H) および 400 MHz (^{31}P ; 161.9 MHz の獲得) Varian 分光計により記録した。化学シフトは δ ユニットで表される。MS データを Quattro II 三重四極子質量分析計により得た。自動オリゴヌクレオチド合成を、ミリジーン Expedite DNADNA 合成装置で行った。S の分析は、Oneida 研究サービスによって行われた。

【0364】

(b) ステロイドジスルフィドケタール (1a) の調製

合成スキームは図 43 に示される。エピアンドロステロン (0.5 g)、1, 2-ジチアン-4, 5-ジオール (0.28 g) および p-トルエンスルホン酸 (15 mg) をトルエン (30 mL) に溶かした溶液を、脱水条件下で 7 時間環流した (Dean Stark 装置)。その後、トルエンを、減圧下で除去し、残留物を酢酸エチルに溶解した。この溶液を水で洗い、硫酸ナトリウムで乾燥し、シロップ条の残留物に濃縮した。これをペンタン/エーテル中に一晚静置すると、白色固体 (400 mg) として化合物 1a が得られた。Rf 値 (TLC、シリカプレート、溶離液としてエーテル) は 0.5 であった。比較として、同じ条件下でのエピアンドロステロンおよび 1, 2-ジチアン-4, 5-ジオールの Rf 値は、それぞれ 0.4 および 0.3 である。ペンタン/エーテルからの再結晶により、白い粉末 (融点 110~112℃) を生じた。 ^1H NMR、 δ 3.6、(1H, C^3OH) 3.54-3.39 (2H, m ジチアン環の 2OCH)、3.2-3.0 (4H, m $2\text{CH}_2\text{S}$)、2.1-0.7 (29H, m ステロイドの H)；質量スペクトル (ES^+) $\text{C}_{23}\text{H}_{36}\text{O}_3\text{S}_2$ (M+H) に対する計算値 425.2179、実測値 425.2151 ($\text{C}_{23}\text{H}_{37}\text{O}_3\text{S}_2$) 分析 計算値 15.12、実測値 15

26。

【0365】

(c) ステロイドジスルフィドケタールホスホロアミダイト誘導体(1b)の調製

化合物1a(100mg)をTHF(3mL)に溶解し、ドライアイスアルコール浴で冷却した。N,N-ジイソプロピルエチルアミン(80μL)およびβ-シアノエチルクロロジソプロピルホスホロアミダイト(80μL)を連続して加えた。その後、混合物を室温まで温め、2時間攪拌し、酢酸エチル(100mL)と混ぜ、5%NaHCO₃水溶液で洗い、硫酸ナトリウムで乾燥させ、干し上がるまで濃縮した。残留物を最小量のジクロロメタンに溶かし、ヘキサンを加えて-70℃で沈降させ、真空中で乾燥させ、100mgを生成した。³¹P NMR 146.02。

【0366】

(d) 5'修飾オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体の調製

最後の亜リン酸化工程で化合物1b(図42)を使用した以外には、従来のホスホロアミダイト化学機構を使用して5'修飾オリゴヌクレオチド1c1および1c2をCPG支持体上に構築した。生成物を、濃縮NH₄OHで16時間、55℃で処理することにより支持体から外した。オリゴヌクレオチドを、Hewlett Packard ODS Hyper silカラム(4.6×200nm、5μm粒径)を備えたDionex DX500システムで、TEAA緩衝液(pH7.0)と1%分勾配の95%CH₃CN/5%0.03TEAAを1mL/分の流量で使用して、逆相HPLCにより精製した。疎水性ステロイド基の優れた特徴は、キャップされた誘導体が、キャップが外されたオリゴマーから楽に分離されることである。硫黄で誘導体化したオリゴヌクレオチド11a、11c1、および11c2(図43)を、市販の「5'-チオール-修飾試薬」(C6G1en Research)と、以前に説明されたような(Storhoff, J. J.ら、J. Am. Chem. Soc. 120, 1959-1964)硝酸銀によるトリチル保護基の解離とを使用して調製した。ジスルフィド11c1の調製に関しては、「チオール-修飾C6-S-S」(Glen Research)を最後の亜リン酸化に使用し、末端のジメトキシトリチル基を80%酢酸水溶液中で解離させた。

【0367】

各修飾オリゴヌクレオチドを、固定されたメルカプトヘキシル基を介したオリゴヌクレオチドの固定に使用された方法(Storhoffら(1998)J. Am. Chem. Soc. 120, 1959-1964)により、~13nmの金ナノ粒子に固定化した。これは、クエン酸塩で安定化ナノ粒子(直径~13nm)を56時間末端硫黄置換基(HS-または非環式または環式ジスルフィド)を有するオリゴヌクレオチドを含む緩衝塩溶液に浸漬してから、0.1MまでのNaClを添加し、24時間静置することを含んでいた。ナノ粒子を遠心によってベレットにし、上澄溶液を除去した。ナノ粒子を洗浄し、緩衝液に再懸濁し、再び遠心し、0.1M NaCl、10mMリン酸塩に懸濁した。この方法により、装置プロセスに使用される過剰な硫化オリゴヌクレオチドのない、ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体が得られた。

【0368】

(e) ハイブリダイゼーション

ジスルフィドステロイドアンカーを含むナノ粒子-オリゴヌクレオチドプローブの一体性を評価するために、金ナノ粒子上の修飾オリゴヌクレオチドの固定により、プローブ1c1、1c2、11c1、11c2、および111c1を作製した。与えたシリーズ中のオリゴマーは同じヌクレオチド配列を有するが、5'先端基Yの構造が異なっている。1c1と1c2はステロイド-ジスルフィド先端基を有し、11c1、11c2はメルカプトヘキシル先端基を有し、111c1は非環式ジスルフィド先端基を有する。(dA)₂の鎖はハイブリダイゼーションを促進するための、金とオリゴヌクレオチド認識部分との間のスパーサーとして機能する。硫黄で誘導体化されたオリゴマーの多くは各ナノ粒子に結合する。標的オリゴヌクレオチドとのナノ粒子プローブ対のハイブリダイゼーションは3次元のネットワークの生成と、および赤から青灰色への色の変化につながる(Muci

10

20

30

40

50

c, R. C. ら, J. Am. Chem. Soc. 120, 12674-12675)。

【0369】

プローブのハイブリダイゼーションを、プローブに相補的な配列を含む 79mer オリゴヌクレオチド標的を用いて調べた。(図 43)。その反応は、0.5 M の NaCl、10 mM リン酸塩 (pH 7.0) で、プローブ対 1c1、1c2、および 11c1、11c2、および 111c1、111c2 のコロイド溶液 (各ナノ粒子プローブに関して 50 μ L および 1.0 A₅₂₀ ユニット) に 1 μ L の標的溶液 (10 pmol の 1V) を加えることにより、室温で行った。10 秒、5 分、および 10 分目に、アリコート (3 μ L) を取り、C-18 逆相 TLC プレート上にスポットした。様々なプローブ対はすべて同じに作用した。すなわち、10 秒間の反応のスポットは赤くなり (ナノ粒子が自由であること示す)；10 分間の反応のスポットは紺青灰色となり (ナノ粒子の凝集物の特徴)；5 分間の反応は、赤茶けた青色のスポットを与えた (非結合ナノ粒子と結合ナノ粒子の混合物を示す)。オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションによって達成されるナノ粒子の凝集に関する以前の観察と一致して (Storhoff, J. J. ら, J. Am. Chem. Soc. 120, 1959-1964; Elghanian, Science, 277, 1078-1081; Mucic R. C. ら, J. Am. Chem. Soc. 120, 12674-12675; Mitchell, G. P., J. Am. Chem. Soc. 121, 8122-8123)、反応は可逆的だった。凝集物を 90°C (ナノ粒子を一掃にリンクするオリゴマーの解離温度を超える温度) に温め、熱いうちにスポットすると、赤いスポットが得られた。オリゴヌクレオチド標的を省略したかオリゴヌクレオチド標的がプローブに相補的でない対照実験では、すべての条件下で色が赤かった。

【0370】

本願発明者が結論づけるのは、ステロイドジスルフィドアンカーによって生成されたナノ粒子共役体が、ハイブリダイゼーションプローブとして有効に機能することである。さらに、スポット試験によって判断されるように、様々なアンカーユニットを備えた共役体が、かなりの割合で標的オリゴヌクレオチドと反応する。この特徴は、プローブが、ナノ粒子の表面にかなりの密度のオリゴヌクレオチドを有し、5' 先端基から比較的遠くに離れているヌクレオチド認識部分を有するという予想と一致している。

【0371】

(f) ナノ粒子プローブとジチオスレイトールの反応

金ナノ粒子がメルカプトヘキシルオリゴヌクレオチドを装填した金ナノ粒子のコロイド溶液へのチオール基の追加は、ナノ粒子の凝集につながる。色は赤から紺青まで変化し、静置すると、暗色沈殿物が沈着する。蛍光標識したオリゴヌクレオチドを有するナノ粒子の実験で実証されるように、チオールは、金表面に結び付けられたメルカプトアルキルオリゴヌクレオチドを置換する (Mucic, R. C. (1999) Synthetic Programmable Nanoparticle Assembly Using DNA PhD 論文、ノースウェスタン大学)。オリゴヌクレオチドナノ粒子共役体のハイブリダイゼーションによって起こった凝集とは対照的に、そのような反応は不可逆であり、加熱しても、NaOH を加えても、凝集物を分解することはできない。

【0372】

本願発明者らは、この色を、ステロイド環式ジスルフィド先端基、メルカプトヘキシル先端基、および非環式ジスルフィド先端基を用いて作製したプローブと DTT との反応をモニタするために使用した。実験は、1 μ L の 1 M DTT 溶液を、0.5 M NaCl および 10 mM リン酸塩 (pH 7.0) の 100 μ L のナノ粒子オリゴヌクレオチドプローブ溶液 (ナノ粒子の 2 A₅₂₀ ユニット) に加え、次に、様々な時間に 3 μ L のアリコート を TLC プレート上にスポットし、色を観察するにより行った。表 1 に示されるように、メルカプトヘキシル (11c1 と 11c2) と非環式オリゴヌクレオチド先端基 (111c1) を備えたオリゴヌクレオチドに由来するコロイドプローブは、急速に反応した。赤青色のスポットが 20 秒で得られ、強い青色のスポットが 5 分以内に得られた。10 0 分までに、ほとんどの金は沈殿した。対照的に、ステロイド環式ジスルフィド先端基 (

10

20

30

40

50

I c 1、I c 2)を用いて作製したプローブの反応では、40分以内に、色の変化が観察されなかった。I l c 1、I l c 2を用いて作製したプローブで得られたのと同じ色に達するには100分かかった。I l l c 1では20秒かかった。これに基づいて、本願発明者らは、ステロイドジスルフィドプローブのDTTとの反応速度は、他のプローブの反応速度の約300分の1であると推測する、非環式ジスルフィドアンカー-3cから作製したプローブは、メルカプトヘキシルアンカーから作製したプローブとほぼ同じ速度で反応する。この後者の結果は、非環式ジスルフィドの金との反応がS-S結合の開裂に関与しているという証拠を考慮すれば、驚くことではない(Zhong, C. J., Langmuir, 15, 518-525)。従って、非環式先端基を備えたオリゴヌクレオチドは、メルカプトヘキシル-オリゴヌクレオチド誘導体の場合のように、1つの硫黄原子によって恐らく金にリンクされるだろう。

【0373】

DTTの存在下で静置した後に、I c 1およびI c 2から作製したプローブが実際にハイブリダイゼーションプローブとして依然として機能するかどうか確かめるために、本願発明者らは、表1の反応に使用した条件下でプローブ混合物の2つのサンプルをDTTで処理した。30分後に、1μLの79mer標的オリゴヌクレオチド溶液(10pmol)を加えた。サンプルを急速凍結し、解凍し、スポット試験によって測定した。標的を含むサンプルのスポットは青く、標的を欠く対照のスポットは赤かった。これは、ナノ粒子共役体が安定しているだけでなく、メルカプトヘキシルカ線形ジスルフィドアンカー基に由来するプローブの凝集を生じさせる条件下でDTTに暴露した後でプローブとして有効であることを実証した。

【0374】

【表10】

表1. DTTとの金ナノ粒子プローブの反応によって生じた色

Ic1+Ic2	時間0	20秒	5分	40分	100分
	赤	赤	赤	赤	赤-青
Ilc1+Ilc2	赤	赤-青	青	青	(黒色沈殿)
IIlc1	赤	赤-青	青	青	(黒色沈殿)

(g) 結論

この環式ジスルフィドリンカーを用いて作られた金ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体は、特定のオリゴヌクレオチド配列を検出するのに有効なプローブとして機能し、従来のメルカプトヘキシルまたは非環式ジスルフィドユニットを用いて作製された対応する共役体よりも、ジチオスレイトールへのはるかに大きな安定性を示す。チオール不活性化に対する高い安定性は、少なくとも一部では、2つの硫黄原子によって各オリゴヌクレオチドを金に固定することに因ると考えられる。

【0375】

実施例24: 単純な環式ジスルフィドリンカーを使用したオリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子の調製

この実施例では、本願発明者らは非ステロイド環式ジスルフィドリンカーと、このリンカーからオリゴヌクレオチド-ナノ粒子プローブとを調製し、ステロイド環式ジスルフィドとアルキルチオールリンカーにより調製されたプローブに対する、チオール含有溶液の存在下でのプローブ安定性を評価した。アルキルチオールアンカー基I(図44) [C. A. Mirkinら、Nature, 382, 607 (1996); Storchoffら、J. Am. Chem. Soc. 120, 1959 (1998)]またはステロイド環式ジスルフィドアンカー基II(図44) [R. L. Letsingerら、Bioconjugate Chemistry, 11, 289 (2000)]を使用して金ナノ粒子にオリゴヌクレオチドを結合することにより、DNAまたはRNAの配列を検出するため

のブローブの調製方法が記載されている。ブローブとしてステロイド環式ジスルフィドリンカーを使用して調製した共役体は、メルカプトエタノールやジチオスレイトール（DTT）のようなチオール化合物の存在下ではかにより安定している点でアルキルチオールアンカーを使用して調製した共役体よりも遊離であることがわかった。検出するDNAサンプルを増幅するのに使用されるPCR溶液は、酵素を保護するために少量のDTTを含んでいるため、この特徴は重要である。PCR産物の単純かつ迅速な検出の場合、最初に増幅されたDNAを分離せずにPCR溶液中で直接試験を行えるように、DTTへの高い安定性をもつブローブを使用することが望ましい。

【0376】

2つの特徴がステロイド環式アンカー（化合物1、図42）を際だたせている。すなわち、（1）環式ジスルフィド（金表面で所与オリゴヌクレオチドを保持するのに共同的に作用する2つの結合部位を原則的に与えることができる）と、（2）疎水の相互作用により金上の隣接鎖を安定させることが可能なステロイドユニット（例えばR. L. Letsingerら、J. Am. Chem. Soc. 115, 7535（1993）参照）である。それらの寄与の重要性を評価するために、本願発明者らは、ステロイド基を欠く環式ジスルフィド化合物11c（図44）によって固定された金共役体を調製し、調べた。

【0377】

トランス-1, 2-ジチアノ-4, 5-ジチオールを、トルエン中でアセトールと加熱することにより調製した化合物2aを、シアノエチルN, N-ジ-1-プロピルホスホロアミダイト試薬2bに変換した。該試薬2bは、修飾オリゴヌクレオチド2c1および2c2の合成の最終結合ステップに使用した。1つの金共役体ブローブを、2c1および等モル量の2dでコロイド溶液を処理することにより調製した。2dは金表面上の希釈剤として機能する。コンパニオンブローブを、2c2および2dから同様に作製した。これらのナノ粒子共役体は、静置と、凍結・融解との両方に関して、塩化ナトリウム溶液の0.1, 0.3, 0.5, 0.7Mの範囲で安定していた。

【0378】

（a）化合物2a, 2b, 2c1, 2c2の調製
実施例23に記述したように化合物2aを調製した。2aの亜リン酸化とオリゴヌクレオチド2c1および2c2の合成を、実施例23や他の箇所でステロイド環式ジスルフィド誘導体に関して先に述べたように行った[R. L. Letsingerら、Bioconjugate Chemistry, 11, 289（2000）]、この文献の開示は引用によりその全体が組み込まれる]。CPG支持体上のオリゴマーに11bを縮合することに関与するステップの反応時間は、10分であった。

【0379】

（b）金-オリゴヌクレオチド共役体の調製

1. 7 μ Mol/mLの各オリゴヌクレオチドを含む溶液を提供するために、等モル量のオリゴヌクレオチド2c1および2dまたは2c2および2dを13 nmの金コロイド（～10 nm）に加えた。該溶液を暗所で24時間保存し、その後、塩類を加えて、該溶液を0.3 M NaCl、10 mM リン酸塩（pH 7.0）、0.01%アジ化ナトリウムとなるようにした。24時間後に、NaCl濃度を0.8 Mに増大し、溶液をさらに24時間静置した。その後、凝集物を除去するためにコロイドをろ過し、溶液を速心によりナノ粒子を集める。ペレットを、ナノピュア水で洗浄し、再び過心し、0.1 M NaCl、10 mM リン酸緩衝液（pH 7.0）、0.01%アジ化ナトリウムに再分散した。

【0380】

（c）ナノ粒子ブローブとジチオスレイトールの反応

置換の研究は、20 μ Lの2c1と2c2から得たコロイド共役体の等量混合物に、2 μ Lの0.1 M DTTを加えることにより、室温（22℃）で行った。アリコート（3 μ L）を定期的に取り、白いナイロン膜上にスポットした。最初、スポットは赤かった。DTTによる金からのオリゴヌクレオチド硫黄誘導体の置換により、スポット試験で青灰色のスポットを与える混合物が生じた。DTTによる置換の時間を、混合物がスポット試験

10

20

30

40

50

で強い青灰色を与える時間として採用した。2 c 1 および 2 c 2 に由来する共役体の混合物の場合、この時は 10 時間だった。

【0381】

比較のために、オリゴヌクレオチド共役体を、同様にメルカプトヘキシルアンカー（化合物 2、図 4 2）およびステロイド環式ジスルフィドアンカー（化合物 1、図 4 2）を使用して、オリゴヌクレオチド配列 c 1 および c 2（図 4 4）から調製した。青灰色のスポットを与える時間によって測定される、単チオール誘導体（2 および図 4 2）およびステロイド環式ジスルフィドから調製した共役体の反応時間は、それぞれ 5 分と 53 時間であった。これらの値は、メルカプトアルキル誘導体、非ステロイド環式ジスルフィドおよびステロイド環式ジスルフィドに由来するナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体に対する相対安定性の 1、~60、~300 に対応する。結果は、環式ジスルフィドアンカーユニット自体が、これらの系でメルカプトアルキル基に対して高い安定性を与えるのに十分であることを示す。化合物 1 に由来するナノ粒子共役体中の大きな疎水基も、オリゴヌクレオチドのチオール置換に対して安定性を増強するのに役割を果たしているように思われる。

【0382】

実施例 25：オリゴヌクレオチド修飾金ナノ粒子の調製

この実施例では、本願発明者らは、チオール含有溶液の存在下での、アルキルチオールおよびステロイド環式ジスルフィドリankerと比較した、新しい非環式ジスルフィドリankerであるトリチオールの安定性を評価した。比較のために、メルカプトヘキシルアンカー（化合物 5、図 4 5）およびステロイド環式ジスルフィドアンカー（化合物 6、図 4 5）を備えたオリゴヌクレオチドを調製した。

【0383】

(a) 5'-トリメルカプトアルキルオリゴヌクレオチドの合成および特徴付け

図 4 7 に示したように、5'-トリメルカプトアルキルチオールオリゴヌクレオチドを合成した。Trembler ホスホロアミダイト 7 (Glen Research社、バーニア州スターリング) (図 4 5) およびチオール修飾剤 C6-S-S ホスホロアミダイトを、CPG 支持体に結合された保護オリゴマーの 5' 端に逐次結合した。生成物を CPG から解離し、上述のように精製した。3 つの DMT 基を備えたトリチオールオリゴヌクレオチドに対する保持時間は、約 6 4 分である。続いて、5'-DMT 基を、80 % 酢酸に 30 分間オリゴヌクレオチドを溶解し、その後蒸発により取り外した。オリゴヌクレオチドを 500 μ L のナノピュア水に再溶解した、溶液を酢酸エチル (3 \times 300 μ L) で抽出した。溶媒の蒸発後、オリゴヌクレオチドを白色固体として得られた。DMT 基がないこの 5'-トリジスルフィドオリゴヌクレオチドの保持時間は、逆相カラムで約 35 分であり、イオン交換カラムでは 2 4 分であった。これらのピークはいずれもスベクトル面積の 97 % 以上であり、オリゴヌクレオチドが高純度であることを示している。オリゴヌクレオチド 8 (図 4 5) の式量を、エレクトロスプレー MS (計算値 12242.85、実測値 12244.1) により得た。DNA 鎖上の 3 つのジスルフィド基を 5' モノチオール DNA に対して上述したようにトリチオール基に還元し、その後、NAP-5 カラムでオリゴヌクレオチドを精製した。

【0384】

(b) 5'-チオールまたはジスルフィド DNA 修飾金ナノ粒子の調製

ベクター研究所 (カリフォルニア州 Burlingame) より購入した金のナノ粒子を使用した。10 mL の 30 nm 金コロイドに、5 OD のチオール修飾 DNA を添加した。溶液を、徐々に 0.3 M NaCl / 10 mM リン酸ナトリウム緩衝液 (pH 7) (PBS) にした。その後、ナノ粒子を遠心によって沈降させた。無色の上清を除去した後、赤色の油状沈殿物を 10 mL の新しい PBS 緩衝液に再分散した。このプロセスを繰り返すことにより、コロイドを 10 mL の新しい PBS 緩衝液を用いて 2 回洗浄した。

【0385】

(c) チオール DNA 修飾金ナノ粒子の安定性試験

固体の DTT を、DTT 濃度が 0.017 M となるまで、様々な種類のチオールまたはジ

10

20

30

40

50

スルフィドDNAで修飾した30nm金ナノ粒子コロイドの600μL溶液に加えた。D T Tがオリゴヌクレオチドを置換するにつれて、コロイドの色は赤から青に代わる。UV/VISスペクトルを時間の関数として取った。分散した30nm金粒子に関連する〜528nmの吸光度は減少し始め、700nmの広幅のバンドが伸び始めた。700nmのバンドはコロイドの凝集に関連している。図48に示されるように、1つのチオールオリゴヌクレオチド(1)で修飾した30nm金の粒子は、0.017M D T Tで迅速に凝集物を形成し、1.5時間後にはコロイドが完全に青くなる。ジスルフィドオリゴヌクレオチド(4)で修飾したナノ粒子を含む溶液は、同一条件下では20時間後に青くなる。トリチオールオリゴヌクレオチド(開裂した6)で修飾したナノ粒子では、溶液が青くなるのに40時間かかった。

10

【0386】

本明細書に引用した特許、特許出願および参考文献はすべて、引用によりその全体が組み込まれる。

【図面の簡単な説明】

【図1】相補的オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を結合させることによるナノ粒子凝集体の形成を示す略図。ナノ粒子は、相補的オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの結果として凝集体をなして結合している。Xは、 $(-S(CH_2)_3OP(O)(O^-))_n$ (ここで、Sは金ナノ粒子に接合している)などの任意の共有結合アンカーを表す。図1および後続のいくつかの図面では、分かり易くするために、各ナノ粒子には単一のオリゴヌクレオチドしか付着していないように示されているが、実際には、各ナノ粒子には、いくつかのオリゴヌクレオチドが付着している。また、図1および後続図面において、金ナノ粒子とオリゴヌクレオチドとの相対サイズは正確な縮尺率では描かれていない点に留意することが重要である。

20

【図2】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いて核酸を検出する系を示す略図。2つのナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、示されている一本鎖DNAの2つの異なる部分に対して相補的な配列を有している。その結果、これらのオリゴヌクレオチドがDNAとハイブリダイズすると、(凝集体を形成し、変色を起こす)検出可能な変化が生じる。

【図3】図2に示されている系の変型の略図。2つのナノ粒子上のオリゴヌクレオチドは、示されているナノ粒子上のオリゴヌクレオチドとは相補的でない第3部分によって分離された一本鎖DNAの2つの異なる部分に対して相補的な配列を有している。一本鎖DNAの非相補的部分とのハイブリダイズに用い得る任意のフィラーオリゴヌクレオチドも示されている。DNA、ナノ粒子およびフィラーオリゴヌクレオチドを混ぜると、ナノ粒子は、切れ目が入った(nicked)二本鎖オリゴヌクレオチドコネクタを形成して凝集する。

30

【図4】連結オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションおよびデハイブリダイゼーションの結果としての、オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子の可逆的凝集を示す略図。例示されている連結オリゴヌクレオチドは、ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドと相補的なオーバーハング末端(付着末端)を有する二本鎖DNAである。

【図5】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子とナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドに対して相補的な配列を有する連結オリゴヌクレオチドとを混ぜることによるナノ粒子凝集体の形成を示す略図。

40

【図6A】それぞれ異なるオリゴヌクレオチドが付着している2つの種類のコロイドと、ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドと相補的な付着末端を有する連結二本鎖オリゴヌクレオチドが入ったキュベット(図4参照)。キュベットAー連結DNAのTmを超える80℃でデハイブリダイズ(熱変性)した。色は暗赤色。

【図6B】それぞれ異なるオリゴヌクレオチドが付着している2つの種類のコロイドと、ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドと相補的な付着末端を有する連結二本鎖オリゴヌクレオチドが入ったキュベット(図4参照)。キュベットBーリンカーDNAのTmより低い室温に冷却後、ハイブリダイゼーションが起って、ナノ粒子は凝集したが、

50

凝集体は沈殿しなかった。色は紫色。

【図 6 C】それぞれ異なるオリゴヌクレオチドが付着している 2 つの種類の金コロイドと、ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドと相補的な付着末端を有する連結二本鎖オリゴヌクレオチドとが入ったキューベット（図 4 参照）。キューベット C-室温下に数時間後、凝集したナノ粒子はキューベットの底に沈殿した。溶液は清澄で、沈殿物はピンクがかった灰色。B または C を加熱すると A が生じる。

【図 7】図 4 に示されているように、オリゴヌクレオチドが付着している金ナノ粒子が温度を下げてと連結オリゴヌクレオチドとハイブリダイズしたために凝集するときの吸光度の変化を示す吸光度対波長 (nm) のグラフ。

【図 8 A】図 4 に示されている系に関する吸光度対温度/時間の変化のグラフである。低温下、オリゴヌクレオチドが付着している金ナノ粒子は、連結オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより凝集する（図 4 参照）。高温（80℃）下で、ナノ粒子はデハイブリダイズする。経時的な温度の変化は、これが可逆的プロセスであることを示している。

【図 8 B】修飾していない金ナノ粒子の水溶液を用いて図 8 A と同じ方法で実施した吸光度対温度/時間における変化のグラフである。図 8 A に見られた可逆的变化は観測されない。

【図 9 A】透過型電子顕微鏡 (TEM) 画像。金ナノ粒子上のオリゴヌクレオチドと連結オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより結合した凝集金ナノ粒子の TEM 画像である。

【図 9 B】透過型電子顕微鏡 (TEM) 画像。結合したナノ粒子の順序づけ (ordering) を示す二次元凝集体の TEM 画像である。

【図 10】ピリミジン：プリン：ピリミジンモチーフを有するナノ粒子間の熱安定性三本鎖オリゴヌクレオチドコネクタの形成を示す略図。このような三本鎖コネクタは、二本鎖コネクタより剛性が大きいため、図 10 において、一方のナノ粒子には、全てがプリンからなるオリゴヌクレオチドが付着しており、他方のナノ粒子には、全てがピリミジンからなるオリゴヌクレオチドが付着している。（ナノ粒子には付着していない）三本鎖コネクタを形成するための第 3 オリゴヌクレオチドはピリミジンからなる。

【図 11】相補的オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を合わせることによるナノ粒子凝集体の形成を示す略図であり、ナノ粒子は、相補的オリゴヌクレオチドのハイブリダイゼーションの結果として凝集体をなして結合している。図 11 において、丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、s はチオールキルリンカーである。2 種類のナノ粒子上の多数のオリゴヌクレオチドは、互いにハイブリダイズして凝集体構造を形成し得る。

【図 12 A】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体 1 および 2 と、一本鎖オリゴヌクレオチド標的 3 が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、点線および破線は、ヌクレオチドを連結するつなぎ目を表す。

【図 12 B】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体 1 および 2 が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、点線および破線は、ヌクレオチドを連結するつなぎ目を表す。

【図 12 C】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体 1 および 2 と、一本鎖オリゴヌクレオチド標的 4 が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、点線および破線は、ヌクレオチドを連結するつなぎ目を表す。

【図 12 D】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体 1 および 2 と、一本鎖オリゴヌクレオチド標的 5 が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、点線および破線は、ヌクレオチドを連結するつなぎ目を表す。

10

20

30

40

50

【図12E】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体1および2と、一本鎖オリゴヌクレオチド標的6が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、点線および破線は、ヌクレオチドを連結するつなぎ目を表す。

【図12F】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体1および2と、一本鎖オリゴヌクレオチド標的7が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、点線および破線は、ヌクレオチドを連結するつなぎ目を表す。

【図13A】ナノ粒子および透明基板を用いたDNA（検体DNA）検出系を示す略図である。

10

【図13B】ナノ粒子および透明基板を用いたDNA（検体DNA）検出系を示す略図である。

【図14A】オリゴヌクレオチドが付着している金ナノ粒子（その1つの集団は溶液中にあり、1つの集団は図13Bに示されているような透明基板に付着している）が連結オリゴヌクレオチドとのハイブリダイゼーションにより凝集したときの吸光度の変化を示す吸光度対波長（nm）のグラフである。

【図14B】温度の増大（融解する）に従った、図14Aに示されているハイブリダイゼーションに関する吸光度の変化のグラフである。

【図15A】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体1および2が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、Sはチオールキリンカーを表す。

20

【図15B】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体1および2と、一本鎖オリゴヌクレオチド標的3が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、Sはチオールキリンカーを表す。

【図15C】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体1および2と、一本鎖オリゴヌクレオチド標的4が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、Sはチオールキリンカーを表す。

【図15D】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体1および2と、一本鎖オリゴヌクレオチド標的5が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、Sはチオールキリンカーを表す。

30

【図15E】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体1および2と、一本鎖オリゴヌクレオチド標的6が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、Sはチオールキリンカーを表す。

【図15F】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体1および2と、一本鎖オリゴヌクレオチド標的7が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、Sはチオールキリンカーを表す。

40

【図15G】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を示す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体1および2と、一本鎖オリゴヌクレオチド標的8が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、Sはチオールキリンカーを表す。

【図16A】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を表す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体1および2と、長さ異なる複数の一本鎖オリゴヌクレオチド標的が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、Sはチオールキリンカーを表す。

【図16B】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を表す略図

50

。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体1および2と、長さが異なる複数の一本鎖オリゴヌクレオチド標的が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、Sはチオールキリンカーを表す。

【図16C】オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系を表す略図。オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体1および2と、長さが異なる複数の一本鎖オリゴヌクレオチド標的が示されている。丸はナノ粒子を表し、式はオリゴヌクレオチド配列であり、Sはチオールキリンカーを表す。

【図17A】ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と、オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系とを示す略図。丸はナノ粒子を表し、直線はオリゴヌクレオチド鎖（塩基は示さず）を表し、間隔の狭い2本の平行線は二本鎖分子セグメントを表し、小文字は特異的ヌクレオチド配列（aはa'と相補的、bはb'の相補的である、など）を示す。

10

【図17B】ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と、オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系とを示す略図。丸はナノ粒子を表し、直線はオリゴヌクレオチド鎖（塩基は示さず）を表し、間隔の狭い2本の平行線は二本鎖分子セグメントを表し、小文字は特異的ヌクレオチド配列（aはa'と相補的、bはb'の相補的である、など）を示す。

【図17C】ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と、オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系とを示す略図。丸はナノ粒子を表し、直線はオリゴヌクレオチド鎖（塩基は示さず）を表し、間隔の狭い2本の平行線は二本鎖分子セグメントを表し、小文字は特異的ヌクレオチド配列（aはa'と相補的、bはb'の相補的である、など）を示す。

20

【図17D】ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と、オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系とを示す略図。丸はナノ粒子を表し、直線はオリゴヌクレオチド鎖（塩基は示さず）を表し、間隔の狭い2本の平行線は二本鎖分子セグメントを表し、小文字は特異的ヌクレオチド配列（aはa'と相補的、bはb'の相補的である、など）を示す。

【図17E】ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と、オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子を用いた核酸検出系とを示す略図。丸はナノ粒子を表し、直線はオリゴヌクレオチド鎖（塩基は示さず）を表し、間隔の狭い2本の平行線は二本鎖分子セグメントを表し、小文字は特異的ヌクレオチド配列（aはa'と相補的、bはb'の相補的である、など）を示す。

30

【図18】リボソーム（大きい二重丸）、ナノ粒子（小さい白丸）および透明基板を用いた核酸検出系を示す略図。黒い四角はコレステリル基を表し、ねじれ線はオリゴヌクレオチドを表し、梯子は二本鎖（ハイブリダイズした）オリゴヌクレオチドを表す。

【図19A】金ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体が図13Aに示されているような透明基板上の多重層として集合したときの吸光度の変化を示す吸光度対波長（nm）のグラフである。

【図19B】温度の増大（融解）に従った図19Aに示されているハイブリダイズした系に関する吸光度の変化のグラフである。

40

【図20A】金属もしくは半導体消光ナノ粒子（図20A）に付着している蛍光標識オリゴヌクレオチドを用いた計画の略図。

【図20B】非金属、非半導体粒子（図20B）に付着している蛍光標識オリゴヌクレオチドを用いた計画の略図。

【図21】オリゴヌクレオチドが付着している金ナノ粒子および蛍光標識オリゴヌクレオチドが付着しているラテックスミクロスフェアを用いた標的核酸検出系を示す略図。小さい黒丸はナノ粒子を表し、大きい白丸はラテックスミクロスフェアを表し、大きい楕円は微孔質膜を表す。

【図22】2つの種類の蛍光標識オリゴヌクレオチド-ナノ粒子共役体を用いた標的核酸検出系を示す略図。黒丸はナノ粒子を表し、大きな楕円は微孔質膜を表す。

50

【図 2 3】炭疽菌保護抗原（実施例 1 2 参照）用アッセイに利用される材料の配列。

【図 2 4】オリゴヌクレオチド（直線）が付着している磁気ナノ粒子（黒球）、ナノ粒子に付着しているオリゴヌクレオチドにハイブリダイズしたプローブオリゴヌクレオチド（直線）を含む「サテライトプローブ」を用いた標的核酸検出系を示す略図であり、プローブオリゴヌクレオチドはレポーター基（白四角）で標識されている。A、B、C、A'、B'、および C' は、特異的なヌクレオチド配列を表し、A、B および C はそれぞれ、A'、B' および C' と相補的である。

【図 2 5 A】ナノ粒子と透明基板を用いた DNA 検出系を示す略図。これらの図面において、a、b および c は、異なるオリゴヌクレオチド配列を表し、a'、b' および c' は、それぞれ a、b および c と相補的なオリゴヌクレオチド配列を表す。

10

【図 2 5 B】ナノ粒子と透明基板を用いた DNA 検出系を示す略図。これらの図面において、a、b および c は、異なるオリゴヌクレオチド配列を表し、a'、b' および c' は、それぞれ a、b および c と相補的なオリゴヌクレオチド配列を表す。

【図 2 6】CdSe/ZnS コア/シェル量子ドット (QD) の集合体を形成する系を示す略図。

【図 2 7】(A) は、400 nm での励起で、分散 QD と凝集 QD を比較する蛍光スペクトルを示している。試料は同じように調製したが、但し、一方には相補的「リンカー」DNA を付加し、他方には等量、等濃度の非相補的 DNA を付加した。(B) は、「融解」の前、間および後の異なる温度下の QD/QD 集合体の UV-可視スペクトルを示している。図中の挿入図は、集合体の熱変性に関する温度対消光プロファイルを示している。変性実験は、0.3 M NaCl、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7)、0.01% アジ化ナトリウム中、13 nm の金ナノ粒子および/または ~4 nm の CdSe/ZnS コア/シェル QD を用いて実施した。(C) は、ハイブリッド金/QD 集合体の一部の高解像度 TEM 画像を示している。指紋に似た QD の格子干渉縞が各金ナノ粒子の近くに見える。(D) は、「融解」の前、間および後の異なる温度下のハイブリッド金/QD 集合体の UV-可視スペクトルを示している。図中の挿入図は、集合体の熱変性に関する温度対消光プロファイルを示している。変性実験は、0.3 M NaCl、10 mM リン酸緩衝液 (pH 7)、0.01% アジ化ナトリウム中、13 nm の金ナノ粒子および/または ~4 nm の CdSe/ZnS コア/シェル QD を用いて実施した。

20

【図 2 8 A】コアプローブ、凝集体プローブの作製およびこれらのプローブを用いた DNA 検出系を示す略図。これらの図面において、a、b、c および d は、異なるオリゴヌクレオチド配列を表し、a'、b'、c' および d' はそれぞれ、a、b、c および d と相補的なオリゴヌクレオチド配列を表す。

30

【図 2 8 B】コアプローブ、凝集体プローブの作製およびこれらのプローブを用いた DNA 検出系を示す略図。これらの図面において、a、b、c および d は、異なるオリゴヌクレオチド配列を表し、a'、b'、c' および d' はそれぞれ、a、b、c および d と相補的なオリゴヌクレオチド配列を表す。

【図 2 8 C】コアプローブ、凝集体プローブの作製およびこれらのプローブを用いた DNA 検出系を示す略図。これらの図面において、a、b、c および d は、異なるオリゴヌクレオチド配列を表し、a'、b'、c' および d' はそれぞれ、a、b、c および d と相補的なオリゴヌクレオチド配列を表す。

40

【図 2 8 D】コアプローブ、凝集体プローブの作製およびこれらのプローブを用いた DNA 検出系を示す略図。これらの図面において、a、b、c および d は、異なるオリゴヌクレオチド配列を表し、a'、b'、c' および d' はそれぞれ、a、b、c および d と相補的なオリゴヌクレオチド配列を表す。

【図 2 8 E】コアプローブ、凝集体プローブの作製およびこれらのプローブを用いた DNA 検出系を示す略図。これらの図面において、a、b、c および d は、異なるオリゴヌクレオチド配列を表し、a'、b'、c' および d' はそれぞれ、a、b、c および d と相補的なオリゴヌクレオチド配列を表す。

【図 2 9】メルカプトエタノールによる、オリゴヌクレオチドが付着しているナノ粒子 (

50

黒丸)または金薄膜(白四角)からのオリゴヌクレオチドの置換分率のグラフ。

【図30】ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体の調製に使用される、様々な認識オリゴヌクレオチド:希釈剤オリゴヌクレオチド比に対して得られた、ナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドの表面被覆範囲のグラフ。

【図31】ナノ粒子上の認識オリゴヌクレオチドの様々な表面被覆範囲に対する、ハイブリダイズした相補的なオリゴヌクレオチドの表面被覆範囲のグラフ。

【図32】ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体および銀染色法による増幅を用いた基板上の4素子アレイ中の標的DNAを検出する系を示す略図。

【図33】平台型スキヤナを用いて得た、7mm×13mmのオリゴヌクレオチド官能化フロートガラススライドの画像。(A)DNA標的と金ナノ粒子-オリゴヌクレオチド指示共役体とがハイブリダイズする前のスライド。(B)10nMの標的DNAと5nMのナノ粒子-オリゴヌクレオチド指示共役体とがハイブリダイズした後のスライドA。ピンク色は赤い直径13nm金ナノ粒子が付着したためである。(C)銀増幅溶液に5分間暴露した後のスライドB。(D)(A)と同じ。(E)100pMの標的と5nMのナノ粒子-オリゴヌクレオチド指示共役体とがハイブリダイズした後のスライドD。ナノ粒子層の吸光度は低過ぎて肉眼またはプラットフォームで観測できなかった。(F)銀増幅溶液に5分間暴露した後のスライドE。スライドFはスライドCよりはるかに明るく、これは、標的濃度が低いことを示している。(G)5nMのナノ粒子-オリゴヌクレオチド指示共役体に暴露し、かつ銀増幅溶液に5分間暴露した対照スライド。スライドの黒ずみは観測されなかった。

【図34】種々の濃度の標的DNAに暴露した後、5nMの金ナノ粒子-オリゴヌクレオチド指示共役体に暴露し、銀増幅溶液に5分間暴露した、オリゴヌクレオチド官能化ガラス表面のグレースケール(光学密度)のグラフ。

【図35】(A)は、発蛍光団で標識した標的オリゴヌクレオチド官能化ガラス表面からの解離を示すハイブリダイズ標的%対温度のグラフ。(B)は、ナノ粒子で標識した標的(図35B)のオリゴヌクレオチド官能化ガラス表面からの解離を示すハイブリダイズ標的%対温度のグラフ。図35AおよびBにおいて、測定は、ガラス表面上の溶液中の解離した標識の蛍光(図35A)および吸光度(図35B)を測定して実施した。「b」と標示された線は、ガラス上の完全対合オリゴヌクレオチドの解離曲線を示し、「r」と標示されている線は、ガラス上の誤対合オリゴヌクレオチド(1塩基誤対合)の曲線を示している。グラフ中の重線は、各測定に関して所与の温度(各曲線の融解温度 T_m の中間)で解離した標的の分画および発蛍光団およびナノ粒子ベース遺伝子チップに関する予測された配列同定選択率を示している。蛍光(図35A):相補体(69%) / 誤対合(38%) = 1.8:1。吸光度(図35B):相補体(85%) / 誤対合(14%) = 6:1。発蛍光団標識曲線(図35A)の幅は、発蛍光団標識標的の遺伝子チップからの解離に特徴的なものである(Formanら, Molecular Modeling of Nucleic Acids, Leontisら編(ACS Symposium Series 682, American Chemical Society, Washington, D. C., 1998年), 206-228ページ)。

【図36A】合成標的および蛍光標識ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体プローブで攻撃したモデルオリゴヌクレオチド配列の画像。

【図36B】ナノ粒子標識ナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体プローブで攻撃したモデルオリゴヌクレオチド配列の画像。図36AおよびBにおいて、C、A、TおよびGは、基板に付着しているオリゴヌクレオチドに1単塩基変化が起こって標的との完全対合(塩基A)または1塩基誤対合(塩基Aとの完全対合の代わりに塩基C、TまたはG)をもたらし配列上のスポット(要素)を表している。要素C:A:T:Gのグレースケール比は、図36Aに関しては9:37:9:11、図36Bに関しては3:62:7:34である。

【図37】連結核酸(3)を介して結合したナノ粒子(aおよびb)の凝集体(A)または層(B)を形成する系を示す略図。

10

20

30

40

50

【図38A】相補的リンカー-3を介してオリゴヌクレオチド官能化ガラス製顕微鏡スライドにハイブリダイズした金ナノ粒子のaとbの交互層(図37参照)のUV-可視スペクトル。これらのスペクトルは、1(a、 $\lambda_{max}=524\text{nm}$)、2(b、 $\lambda_{max}=529\text{nm}$)、3(c、 $\lambda_{max}=532\text{nm}$)、4(d、 $\lambda_{max}=534\text{nm}$)または5(e、 $\lambda_{max}=534\text{nm}$)層を有する集合体に関する。これらのスペクトルは、スライドを介して直接測定した。

【図38B】層の数の増大に伴うナノ粒子集合体(図38A参照)の λ_{max} での吸光度のグラフ。

【図39A】DNAリンカーと共にオリゴヌクレオチド官能化導電性インジウムスズーオキシド(ITO)スライド(オリゴヌクレオチド官能化ガラススライドと同じ方法で作製)に同時ハイブリダイズしたオリゴヌクレオチド官能化金ナノ粒子の1つの層のFE-SEM。このスライドの可視吸光度スペクトルは、図38Aと同一であったが、これは、ITO上の官能化およびナノ粒子被覆面積がガラス上のものと類似であることを示している。10枚のそのような画像から計数したナノ粒子の平均密度は約800ナノ粒子/ μm^2 であった。

【図39B】ITOスライド上の2つのナノ粒子層のFE-SEM画像。10枚のそのような画像から計数したナノ粒子の平均密度は約2800ナノ粒子/ μm^2 であった。

【図39C】0.3M NaCl、10mM リン酸緩衝液(pH7)中の一本鎖とのオリゴヌクレオチド二本鎖分子(1+2+3;図35A参照)の0.5 μM 溶液の解離を示す260nm(A_{260})の吸光度。

【図39D】0.3M NaCl、10mM 燐酸緩衝液に浸漬したガラススライドからの1層のオリゴヌクレオチド官能化金ナノ粒子の解離を示す260nm(A_{260})の吸光度。

【図39E】0.3M NaCl、10mM 燐酸緩衝液に浸漬したガラススライドからの4層のオリゴヌクレオチド官能化金ナノ粒子の解離を示す260nm(A_{260})の吸光度。

【図39F】0.3M NaCl、10mM 燐酸緩衝液に浸漬したガラススライドからの10層のオリゴヌクレオチド官能化金ナノ粒子の解離を示す260nm(A_{260})の吸光度。図D~Fに関して、温度の増大に従って減少するスライドを介した520nm(A_{520})での吸光度を測定して融解プロファイルを得た。図39D~Fそれぞれの挿入図は、測定した解離曲線の一次導関数を示している。これらの曲線のFWHMは、(図39Cの挿入図)13.2℃、(図39Dの挿入図)5.6℃、(図39Eの挿入図)3.2℃、(図39Fの挿入図)2.9℃であった。

【図40】DNAを介して結合している金ナノ粒子集合体の電気的性質の測定に用いられる系を示す略図。分かり易くするために、単一のハイブリダイゼーション事象のみが描かれている。

【図41】金電極および金ナノ粒子を用いた核酸検出法を示す略図。

【図42】オリゴヌクレオチドをナノ粒子に連結する際に使用されるステロイド部分に有する好ましい化合物1を含む、環式ジスルフィド1の構造を例証する略図。ステロイドジスルフィド分子は、4,5-ジヒドロキシ-1,2-ジチアンをエビアンドロステロンと縮合することにより得られる。金のナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体は、ステロイドジスルフィドにより修飾したオリゴヌクレオチドを使用して調製され、その調製にオリゴヌクレオチド-メルカプトヘキシリンカーを使用したナノ粒子-オリゴヌクレオチド共役体と比べて、DTTに対するより大きな安定性を示す。

【図43】ステロイド環式ジスルフィドアンカー基に対する合成と化学式を示す略図。

【図44】実施例24に説明したオリゴヌクレオチド環式ジスルフィドリンカーの調製に使用される化学式2の環式ジスルフィドと、アンカー基として使用される同様な関連環式ジスルフィドを示す略図。

【図45】実施例25に記述した構造を示す略図。図45(a)は、5'-モノチオール-修飾オリゴヌクレオチド5、3'塩基5'-ステロイドジスルフィドオリゴマー6、T

10

20

30

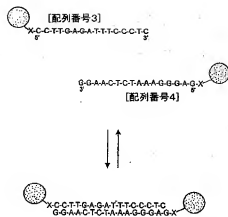
40

50

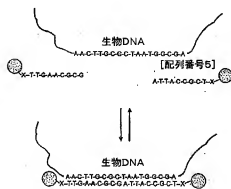
rembler ホスホルアミド 7、および 5-トリメルカプトアルキルオリゴヌクレオチド 8 を示す。

【図 46】新規トリチオールオリゴヌクレオチドを作製する化学的機構を示す略図。

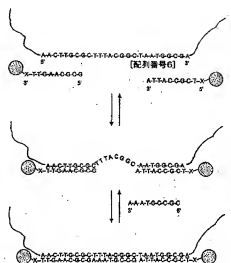
【図 1】



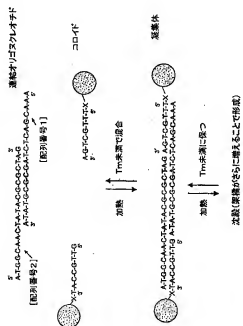
【図 2】



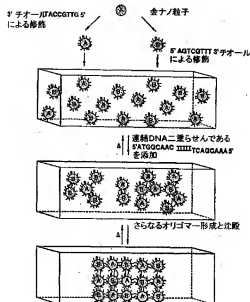
【図 3】



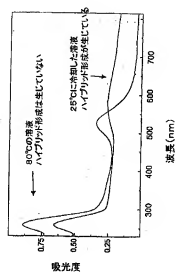
【図 4】



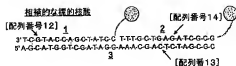
【図 5】



【図 7】



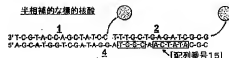
【図12A】



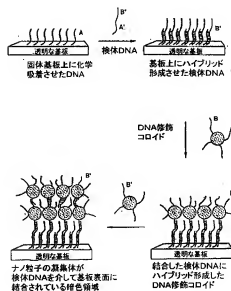
【図12B】



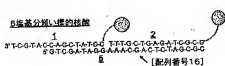
【図12C】



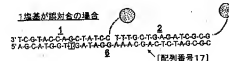
【図13A】



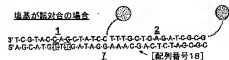
【図12D】



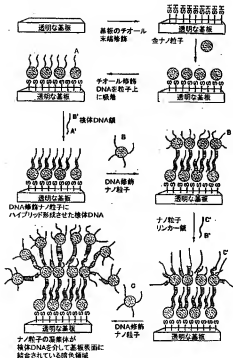
【図12E】



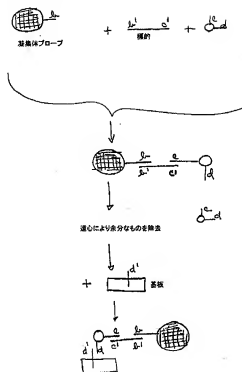
【図12F】



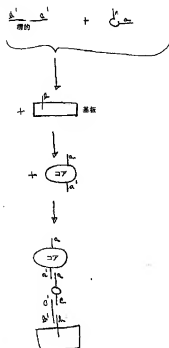
【図13B】



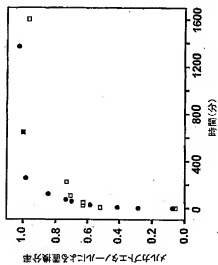
【図 28 D】



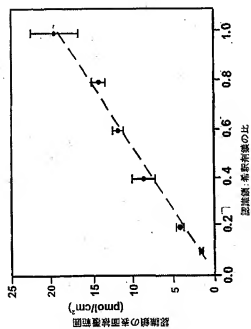
【図 28 E】



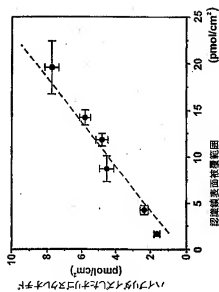
【図 29】



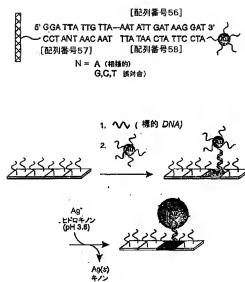
【図 30】



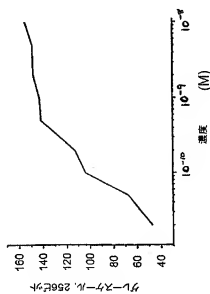
【図 3 1】



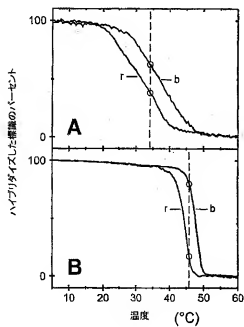
【図 3 2】



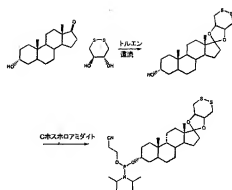
【図 3 4】



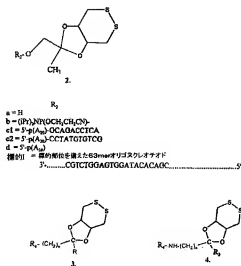
【図 3 5】



【図 4 3】



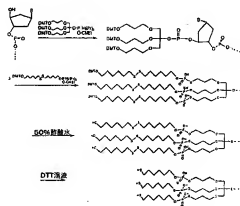
【図 4 4】



R_1 = 水素、アルキル基、アリール基、または置換アルキルまたはアリール基

R_2 = 付置オリゴヌクレオチドまたは修飾オリゴヌクレオチド

【図 4 6】



【国際公開パンフレット】

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(10) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
19 July 2001 (19.07.2001)

PCT

(10) International Publication Number
WO 01/51665 A2

(5) **Intentional Pattern Classifier**

III. 60446 (115); TATON, Thomas, Andrew; 7153 West
Oakland, Apt. 18, Chicago, IL 60637 (108); 14, 741, 910
Shannon Avenue, Apt. 307, Evanston, IL 60201 (15).

(2) Internal Control Application Number: IS-14-021401150

4) Agent: MIAO, Kevly; McDonnell Buckner Walter & Berghoff, 303 South Wacker Drive, Suite 3200, Chicago, IL 60606 U.S.A.

(22) International Filing Date: 12 January 2001 (12.01.2001)

1000

DOI Publication Location

Designated States (continued): AR, AU, AZ, AM, AT, AU, AZ, BA, BR, BG, HR, HU, HZ, CA, CH, CN, CZ, CU, DE, DK, EP, ES, FI, GB, GR, IL, JP, KR, NL, NO, NZ, PL, PT, RU, SE, SI, SK, TR, TH, UA, UG, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(24) Priority Basis:

L3 January 2003 115.01.30000 US\$

20 April 2002 (26 04 2002)	US
26 June 2002 (26 06 2002)	US

12 January 2001 112 01.2001: US

(71) Applicant: MANDOPHORE INC. (US); 1801 Maple Avenue, Houston, TX, (US).

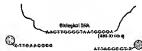
Abb. Designated States (single): AMPC (patent) (IL, OM, KP, IS, MW, NZ, RU, SZ, SZ, TZ, UG, ZM). Eurasian patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM). European patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LL, MC, MT, PT, SE, TR). OAPI patent (BF, BJ, CF, CI, CM, CN, CO, CR, CU, EE, EG, ES, FR, GE, GR, HU, IL, IN, JP, KE, KR, KZ, LY, MA, MG, MK, MN, MU, MV, MW, MY, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SG, SI, SK, SL, SN, SV, TC, TH, TN, TT, UG, UZ, UA, UY, UZ, VN, ZM, ZW).

(72) Inventors: MIRONIN, Ched. A.; 111 16th Street, Wl
studio, H. 00091 1133; LAYSHINGER, Robert, Jr.; 316
Third Street, Williams, D. 00091 003; MUCKE, Robert,
C.; 1005 3rd Ave Drive, Glendale, CA 91201 033.
STORHOFF, James, J.; Apartment 2F, 2124 Ridge
Ave., Princeton, H. 00081 113; EICHMANIAN, Robert,
American 100, 8350 West Colfax Avenue, Chicago

without international search report and to the representative
non receipt of that report

Continued on next page

(50) Title: NANOPARTICLES HAVING OLIGONUCLEOTIDES ATTACHED THERETO AND USES THEREFOR



679) **Abstract:** This invention provides methods of detecting a nucleic acid. The methods comprise contacting the nucleic acid with one or more pairs of probes having oligonucleotide strands attached thereto. In one embodiment of the method, the oligonucleotide strands are attached to nanoparticles and their interactions complementarily to portions of the sequence of the nucleic acid. A derivative thereof (preferably a color change) is visually used to reveal the hybridization of the oligonucleotide strands on the nanoparticle to the nucleic acid. This view is first at a low magnification to reveal the hybridization of the oligonucleotide strands on the nanoparticle to the nucleic acid. A second view is at a higher magnification, the invention forms pairs of nucleic acids of complementary sequences. The complementary sequences are labeled by the oligonucleotide strands and methods of using the complementary sequences. The invention provides nanoparticles and nanosensors comprising nanoparticles and methods of modification of the nanoparticles. Finally, the invention provides a method of analyzing a nucleic acid and from one or more nucleic acids.

WG 01/01/05

PCT/US89/199

**NANOPARTICLES HAVING OLIGONUCLEOTIDES
ATTACHED THERETO AND USES THEREFOR**

5

This invention was made with government support under National Institutes Of Health (NIH) grant GM40265 and Army Research Office (ARO) grant DAAG55-0967-1-0133. The government has certain rights in the invention.

10

This application is a continuation-in-part of pending application number 06/344,667, filed June 25, 1999, which was a continuation-in-part of pending application number 09/240,755, filed January 29, 1999, which was a continuation-in-part of pending PCT application PCT/US89/12783, which was filed July 21, 1997, which are incorporated by reference. Benefit of provisional applications nos.

15

60/021,809, filed July 29, 1996; 60/200,161, filed April 26, 2000; 60/176,402, filed January 13, 2000 is also claimed, the disclosures are incorporated by reference.

FIELD OF THE INVENTION

20

The invention relates to methods of detecting nucleic acids, whether natural or synthetic, and whether modified or unmodified. The invention also relates to materials for detecting nucleic acids and methods of making these materials. The invention further relates to methods of nanofabrication. Finally, the invention relates to methods of separating a selected nucleic acid from other nucleic acids.

25

BACKGROUND OF THE INVENTION

The development of methods for detecting and sequencing nucleic acids is critical to the diagnosis of genetic, bacterial, and viral diseases. See Mansfield, B.S. et al. *Molecular and Cellular Probes*, 9, 145-156 (1995). At present, there are a variety of methods used for detecting specific nucleic acid sequences. *Id.* However, these methods are complicated, time-consuming and/or require the use of specialized and expensive equipment. A simple, fast method of detecting nucleic acids which does not require the use of such equipment would clearly be desirable.

WU 618565

PCT/US00/110

- A variety of methods have been developed for assembling metal and semiconductor colloids into nanomaterials. These methods have focused on the use of covalent linker molecules that possess functionalities at opposing ends with chemical affinities for the colloids of interest. One of the most successful approaches to date, Brust et al., *Adv. Mater.*, **7**, 795-797 (1995), involves the use of gold colloids and well-established thiol adsorption chemistry, Bain & Whitesides, *Inorg. Chem. Int. Ed. Engl.*, **28**, 306-312 (1989) and Dubois & Nuzzo, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **63**, 437-464 (1992). In this approach, linear alkanedithiols are used as the particle linker molecules. The thiol groups at each end of this linker molecule covalently attach themselves to the colloidal particles to form aggregate structures. The drawbacks of this method are that the process is difficult to control and the assemblies are formed irreversibly. Methods for systematically controlling the assembly process are needed if the materials properties of these structures are to be exploited fully.
- The potential utility of DNA for the preparation of biomaterials and in nanofabrication methods has been recognized. In this work, researchers have focused on using the sequence-specific molecular recognition properties of oligonucleotides to design imprecise structures with well-defined geometric shapes and sizes. Shinkman et al., *New J. Chem.*, **17**, 757-763 (1993); Shaw & Wang, *Science*, **260**, 533-536 (1993); Chen et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 6402-6407 (1989); Chen & Seeman, *Nature*, **356**, 631-633 (1991); Smith & Peigan, *Nature*, **356**, 164-168 (1992); Wang et al., *Biochem.*, **32**, 1899-1904 (1993); Chen et al., *Biochem.*, **33**, 13540-13546 (1994); Marsh et al., *Nucleic Acids Res.*, **23**, 696-700 (1995); Minkin, *Annu. Review Biophys. Biomol. Struct.*, **23**, 541-576 (1994); Wells, *J. Biol. Chem.*, **263**, 1095-1098 (1988); Wang et al., *Biochem.*, **30**, 5667-5674 (1991). However, the theory of producing DNA structures is well ahead of experimental confirmation.
- Seeman et al., *New J. Chem.*, **17**, 739-755 (1993).

SUMMARY OF THE INVENTION

- The invention provides methods of cloning nucleic acids. In one embodiment, the method comprises contacting a nucleic acid with a type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto (nanoparticle-oligonucleotide

WO 01/5165

PCT/JP99/01516

conjugate(s). The nucleic acid has at least two portions, and the oligonucleotides on each nanoparticle have a sequence complementary to the sequences of at least two portions of the nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid.

5 The hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid results in a detectable change.

In another embodiment, the method comprises contacting a nucleic acid with at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides on the first type of nanoparticles have a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid. The oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid, and a detectable change brought about by this hybridization is observed.

15 In a further embodiment, the method comprises providing a substrate having a first type of nanoparticles attached thereto. The first type of nanoparticles has oligonucleotides attached thereto, and the oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid. The substrate is contacted with the nucleic acid under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid. Then, a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is provided. The oligonucleotides have a sequence complementary to one or more other portions of the sequence of the nucleic acid, and the nucleic acid bound to the substrate is contacted with the second type of nanoparticles-oligonucleotide conjugates under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles with the nucleic acid. A detectable change may be observable at this point. The method may further comprise providing a binding oligonucleotide having a selected sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles. The binding oligonucleotide is connected with the second type of nanoparticles-oligonucleotide conjugates bound to the substrate under

WU 618465

PCT/US01/0110

conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotide to the oligonucleotides on the nanoparticles. Then, a third type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the binding oligonucleotide, is contacted with the binding oligonucleotide bound to the substrate under conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotide to the oligonucleotides on the nanoparticles. Finally, the detectable change produced by these hybridizations is observed.

In yet another embodiment, the method comprises contacting a nucleic acid with a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with the nucleic acid. Then, the nucleic acid bound to the substrate is contacted with a first type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid. Next, the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates bound to the substrate is contacted with a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides on the second type of nanoparticles having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the first type of nanoparticles, the contacting taking place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first and second types of nanoparticles. Finally, a detectable change produced by these hybridizations is observed.

In another embodiment, the method comprises contacting a nucleic acid with a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with the nucleic acid. Then, the nucleic acid bound to the substrate is contacted with liposomes having oligonucleotides attached thereto,

WU 065145

ECT/ENH/190

the oligonucleotides having a sequence complementary to a portion of the sequence of the nucleic acid. This contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the liposomes with the nucleic acid. Next, the liposome-oligonucleotide conjugates bound to the substrate are contacted with a first type of nanoparticles having at least a first type of oligonucleotides attached thereto. The first type of oligonucleotides have a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles, and the contacting takes place under conditions effective to allow attachment of the oligonucleotides on the nanoparticles to the liposomes as a result of hydrophobic interactions. A detectable change may be observable at this point. The method may further comprise contacting the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates bound to the liposomes with a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The first type of nanoparticles have a second type of oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles, and the oligonucleotides on the second type of nanoparticles having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the second type of oligonucleotides on the first type of nanoparticles. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first and second types of nanoparticles. Then, a detectable change is observed.

In another embodiment, the method comprises contacting a nucleic acid to be detected with a substrate having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of said nucleic acid, the contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with said nucleic acid. Next, said nucleic acid bound to the substrate is contacted with a type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with said nucleic acid. Then, the substrate is

WO 03/05165

ECT/US/03/0110

contacted with silver stain to produce a detectable change, and the detectable change is observed.

- In yet another embodiment, the method comprises providing a substrate having a first type of nanoparticles attached thereto. The nanoparticles have oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected. Then, the nucleic acid is contacted with the nanoparticles attached to the substrate under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with said nucleic acid. Next, an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is provided. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe have oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid. Finally, said nucleic acid bound to the substrate is contacted with the aggregate probe under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the aggregate probe with said nucleic acid, and a detectable change is observed.

- In a further embodiment, the method comprises providing a substrate having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected. An aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is provided. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe have oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid. The nucleic acid, the substrate and the aggregate probe are contacted under conditions effective to allow hybridization of said nucleic acid with the oligonucleotides on the aggregate probe and with the oligonucleotides on the substrate, and a detectable change is observed.

W0015165

PCT/US00/01940

In a further embodiment, the method comprises providing a substrate having oligonucleotides attached thereto. An aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is provided. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe have oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected. A type of nanoparticles having at least two types of oligonucleotides attached thereto is provided. The first type of oligonucleotides has a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid, and the second type of oligonucleotides has a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to the substrate. The nucleic acid, the aggregate probe, the nanoparticles and the substrate are contacted under conditions effective to allow hybridization of said nucleic acid with the oligonucleotides on the aggregate probe and on the nanoparticles and hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the oligonucleotides on the substrate, and a detectable change is observed.

In another embodiment, the method comprises contacting a nucleic acid to be detected with a substrate having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of said nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with said nucleic acid. The nucleic acid bound to the substrate is contacted with liposomes having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a portion of the sequence of said nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the liposomes with said nucleic acid. An aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is provided. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them, at least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe having oligonucleotides attached thereto

WO 03/01665

PCT/JP03/001303

which have a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles. The liposomes bound to the substrate are contacted with the aggregate probe under conditions effective to allow attachment of the oligonucleotides on the aggregate probe to the liposomes as a result of hydrophobic interactions, and a detectable change is observed.

In yet another embodiment, the method comprises providing a substrate having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected. A core probe comprising at least two types of nanoparticles is provided. Each type of nanoparticles has oligonucleotides attached thereto which are complementary to the oligonucleotides on at least one of the other types of nanoparticles. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of the oligonucleotides attached to them. Next, a type of nanoparticles having two types of oligonucleotides attached thereto is provided. The first type of oligonucleotides has a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid, and the second type of oligonucleotides has a sequence complementary to a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to at least one of the types of nanoparticles of the core probe. The nucleic acid, the nanoparticles, the substrate and the core probe are contacted under conditions effective to allow hybridization of said nucleic acid with the oligonucleotides on the nanoparticles and with the oligonucleotides on the substrate and to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the oligonucleotides on the core probe, and a detectable change is observed.

Another embodiment of the method comprises providing a substrate having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected. A core probe comprising at least two types of nanoparticles is provided. Each type of nanoparticles has oligonucleotides attached thereto which are complementary to the oligonucleotides on at least one other type of nanoparticles. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of the oligonucleotides attached to them. A type of linking oligonucleotides comprising a sequence complementary to a second portion of the sequence of said nucleic acid and

WO 01/5665

PCT/US99/1130

a sequence complementary to a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to at least one of the types of nanoparticles of the core probe is provided. The nucleic acid, the linking oligonucleotides, the substrate and the core probe are contacted under conditions effective to allow hybridization of said nucleic acid with the linking oligonucleotides and with the oligonucleotides on the substrate and to allow hybridization of the oligonucleotides on the linking oligonucleotides with the oligonucleotides on the core probe, and a detectable change is observed.

In yet another embodiment, the method comprises providing nanoparticles having oligonucleotides attached thereto and providing one or more types of binding oligonucleotides. Each of the binding oligonucleotides has two portions. The sequence of one portion is complementary to the sequence of one of the portions of the nucleic acid, and the sequence of the other portion is complementary to the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles. The nanoparticle-oligonucleotide conjugates and the binding oligonucleotides are contacted under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the binding oligonucleotides. The nucleic acid and the binding oligonucleotides are contacted under conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotides with the nucleic acid. Then, a detectable change is observed. The nanoparticle-oligonucleotide conjugates may be contacted with the binding oligonucleotides prior to being contacted with the nucleic acid, or all three may be contacted simultaneously.

In another embodiment, the method comprises contacting a nucleic acid with at least two types of particles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides on the first type of particles have a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid and have energy donor molecules on the ends not attached to the particles. The oligonucleotides on the second type of particles have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid and have energy acceptor molecules on the ends not attached to the particles. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the particles with the nucleic acid, and a detectable change

WO 01/6155

PC/DEN/SH/190

brought about by this hybridization is observed. The energy donor and acceptor molecules may be fluorescent molecules.

- In a further embodiment, the method comprises providing a type of
microspheres having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a
sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid and are
5 labeled with a fluorescent molecule. A type of nanoparticles having oligonucleotides
attached thereto and which produce a detectable change is also provided. These
oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence
of the nucleic acid. The nucleic acid is connected with the microspheres and the
10 nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides
on the latex microspheres and on the nanoparticles with the nucleic acid. Then,
changes in fluorescence, another detectable change, or both are observed.

- In another embodiment, the method comprises providing a first type of
metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto.
15 The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the
sequence of the nucleic acid and are labeled with a fluorescent molecule. A second
type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached
thereto is also provided. These oligonucleotides have a sequence complementary to a
second portion of the sequence of the nucleic acid and are also labeled with a
20 fluorescent molecule. The nucleic acid is contacted with the two types of
nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides
on the two types of nanoparticles with the nucleic acid. Then, changes in
fluorescence are observed.

- In a further embodiment, the method comprises providing a type of particle
25 having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a first portion
and a second portion, both portions being complementary to portions of the sequence
of the nucleic acid. A type of probe oligonucleotides comprising a first portion and a
second portion is also provided. The first portion has a sequence complementary to
the first portion of the oligonucleotides attached to the particles, and both portions are
30 complementary to portions of the sequence of the nucleic acid. The probe
oligonucleotides are also labeled with a reporter molecule at one end. Then, the

WO 00/58465

PC/2000/00396

particles and the probe oligonucleotides are contacted under conditions effective to allow for hybridization of the oligonucleotides on the particles with the probe oligonucleotides to produce a satellite probe. Then, the satellite probe is contacted with the nucleic acid under conditions effective to provide for hybridization of the nucleic acid with the probe oligonucleotides. The particles are removed and the reporter molecule detected.

In yet another embodiment of the method of the invention, a nucleic acid is detected by contacting the nucleic acid with a substrate having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid. The oligonucleotides are located between a pair of electrodes located on the substrate. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with the nucleic acid. Then, the nucleic acid bound to the substrate, is contacted with a type of nanoparticles. The nanoparticles are made of a material which can conduct electricity. The nanoparticles will have one or more types of oligonucleotides attached to them, at least one of the types of oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid. If the nucleic acid is present, a change in conductivity can be detected. In a preferred embodiment, the substrate will have a plurality of pairs of electrodes located on it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both. Each of the pairs of electrodes in the array will have a type of oligonucleotides attached to the substrate between the two electrodes.

The invention further provides a method of detecting a nucleic acid wherein the method is performed on a substrate. The method comprises detecting the presence, quantity or both, of the nucleic acid with an optical scanner.

The invention further provides kits for detecting nucleic acids. In one embodiment, the kit comprises at least one container, the container holding at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides on the first type of nanoparticles have a sequence complementary to

WO 03/01555

PC/2003/1190

the sequence of a first portion of a nucleic acid. The oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid.

- Alternatively, the kit may comprise at least two containers. The first container
 5 holds nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The second container holds nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid.

- In a further embodiment, the kit comprises at least one container. The
 10 container holds metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a portion of a nucleic acid and have fluorescent molecules attached to the ends of the oligonucleotides not attached to the nanoparticles.

- In yet another embodiment, the kit comprises a substrate, the substrate having
 15 attached thereto nanoparticles, the nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also includes a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The kit further includes a second
 20 container holding a binding oligonucleotide having a selected sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles in the first container. The kit also includes a third container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a
 25 second portion of the binding oligonucleotide.

- In another embodiment, the kit comprises a substrate having oligonucleotides
 attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first
 portion of a nucleic acid, a first container holding nanoparticles having
 oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the
 30 sequence of a second portion of the nucleic acid, and a second container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence

WU 85/3155

PC/DENRARI/190

complementary to at least a portion of the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the first container.

In yet another embodiment, the kit comprises a substrate, a first container holding nanoparticles, a second container holding a first type of oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid, a third container holding a second type of oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid, and a fourth container holding a third type of oligonucleotides having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the second type of oligonucleotides.

In a further embodiment, the kit comprises a substrate having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also includes a first container holding liposomes having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid and a second container holding nanoparticles having at least a first type of oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles so that the nanoparticles can be attached to the liposomes by hydrophobic interactions. The kit may further comprise a third container holding a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of a second type of oligonucleotides attached to the first type of nanoparticles. The second type of oligonucleotides attached to the first type of nanoparticles have a sequence complementary to the sequence of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles.

In another embodiment, the kit comprises a substrate having nanoparticles attached to it. The nanoparticles have oligonucleotides attached to them which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also includes a first container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least

WU 41/10/05

PCT/US/01/110

one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

In yet another embodiment, the kit comprises a substrate having

- 5 oligonucleotides attached to it. The oligonucleotides have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit further includes a first container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

In an additional embodiment, the kit comprises a substrate having

- oligonucleotides attached to it and a first container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid. The kit also includes a second container holding nanoparticles. The nanoparticles have at least two types of oligonucleotides attached to them. The first type of oligonucleotides has a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid. The second type of oligonucleotides has a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to the substrate.

- In another embodiment, the kit comprises a substrate which has oligonucleotides attached to it. The oligonucleotides have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also comprises a first container holding liposomes having oligonucleotides attached to them. The oligonucleotides have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The kit further includes a second container holding an aggregate

WO 01/05555

PCT/US98/01990

probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a hydrophobic groups attached to the ends not attached to the nanoparticles.

In a further embodiment, the kit may comprise a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The kit also includes one or more additional containers, each container holding a binding oligonucleotide. Each binding oligonucleotide has a first portion which has a sequence complementary to at least a portion of the sequence of oligonucleotides on the nanoparticles and a second portion which has a sequence complementary to the sequence of a portion of a nucleic acid to be detected. The sequences of the second portions of the binding oligonucleotides may be different as long as each sequence is complementary to a portion of the sequence of the nucleic acid to be detected. In another embodiment, the kit comprises a container holding one type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto and one or more types of binding oligonucleotides. Each of the types of binding oligonucleotides has a sequence comprising at least two portions. The first portion is complementary to the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles, whereby the binding oligonucleotides are hybridized to the oligonucleotides on the nanoparticles in the container(s). The second portion is complementary to the sequence of a portion of the nucleic acid.

In another embodiment, the kit may comprise one or two containers holding two types of particles. The first type of particles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The oligonucleotides are labeled with an energy donor on the ends not attached to the particles. The second type of particles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of a nucleic acid. The oligonucleotides are labeled with an energy acceptor on the ends not attached to the particles. The energy donors and acceptors may be fluorescent molecules.

WU 01/0155

PCT/US/01/150

In a further embodiment, the kit comprises a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The kit also includes one or more additional containers, each container holding binding oligonucleotides. Each binding oligonucleotide has a first portion which has a sequence complementary to at least a portion of the sequence of oligonucleotides on the nanoparticles and a second portion which has a sequence complementary to the sequence of a portion of a nucleic acid to be detected. The sequences of the second portions of the binding oligonucleotides may be different as long as each sequence is complementary to a portion of the sequence of the nucleic acid to be detected. In yet another embodiment, the kit comprises a container holding one type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto and one or more types of binding oligonucleotides. Each of the types of binding oligonucleotides has a sequence complementary to at least two portions. The first portion is complementary to the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles, whereby the binding oligonucleotides are hybridized to the oligonucleotides on the nanoparticles in the container(s). The second portion is complementary to the sequence of a portion of the nucleic acid.

In another alternative embodiment, the kit comprises at least three containers. The first container holds nanoparticles. The second container holds a first oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The third container holds a second oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The kit may further comprise a fourth container holding a binding oligonucleotide having a selected sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a portion of the sequence of the second oligonucleotide, and a fifth container holding an oligonucleotide having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the binding oligonucleotide.

In another embodiment, the kit comprises one or two containers, the container(s) holding two types of particles. The first type of particles having oligonucleotides attached thereto that have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid and have energy donor molecules attached to the ends not attached to the nanoparticles. The second type of particles having

WU 0151655

PC(TOOR)1716

oligonucleotides attached thereto that have a sequence complementary to a second portion of the sequence of a nucleic acid and have energy acceptor molecules attached to the ends not attached to the nanoparticles. The energy donors and acceptors may be fluorescent molecules.

- 5 In a further embodiment, the kit comprises a first container holding a type of microsphere having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid and are labeled with a fluorescent molecule. The kit also comprises a second container holding a type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The
10 oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

- In another embodiment, the kit comprises a first container holding a first type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the
15 sequence of a nucleic acid and are labeled with a fluorescent molecule. The kit also comprises a second container holding a second type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. These oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of a nucleic acid and are labeled with a fluorescent molecule.

- 20 In another embodiment, the kit comprises a container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate
25 probe has oligonucleotides attached to it which have a sequence complementary to a portion of the sequence of a nucleic acid.

- In no additional embodiment, the kit comprises a container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe
30 are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles

WO 01/51465

PC/DUS/BJ/191

of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles.

- In a further embodiment, the kit comprises a container holding a satellite probe. The satellite probe comprises a particle having attached thereon
 5 oligonucleotides. The oligonucleotides have a first portion and a second portion, both portions having sequences complementary to portions of the sequence of a nucleic acid. The satellite probe also comprises probe oligonucleotides hybridized to the oligonucleotides attached to the nanoparticles. The probe oligonucleotides have a
 10 first portion and a second portion. The first portion has a sequence complementary to the sequence of the first portion of the oligonucleotides attached to the particles, and both portions have sequences complementary to portions of the sequence of the nucleic acid. The probe oligonucleotides also have a reporter molecule attached to one end.

- In another embodiment, the kit comprising a container holding a core probe, the core probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides
 15 attached thereto, the nanoparticles of the core probe being bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to them.

- In yet another embodiment, the kit comprises a substrate having attached to it at least one pair of electrodes with oligonucleotides attached to the substrate between
 20 the electrodes. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected.

The invention also provides the satellite probe, an aggregate probe and a core probe.

- The invention further provides a substrate having nanoparticles attached
 25 thereto. The nanoparticles may have oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid.

The invention also provides a metallo or semiconductor nanoparticle having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides are labeled with fluorescent molecules at the ends not attached to the nanoparticle.

- 30 The invention further provides a method of nanofabrication. The method comprises providing at least one type of linking oligonucleotide having a selected

WO 03/01555

PCT/US00/1790

sequence, the sequence of each type of linking oligonucleotide having at least two portions. The method further comprises providing one or more types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides on each type of nanoparticles having a sequence complementary to a portion of the sequence of a linking oligonucleotide. The linking oligonucleotides and nanoparticles are contacted under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to the linking oligonucleotides so that a desired nanomaterial or nanostructure is formed.

The invention provides another method of nanofabrication. This method comprises providing at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides on the first type of nanoparticles have a sequence complementary to that of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles. The oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence complementary to that of the oligonucleotides on the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. The first and second types of nanoparticles are contacted under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to each other so that a desired nanomaterial or nanostructure is formed.

The invention further provides nanomaterials or nanostructures composed of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the nanoparticles being held together by oligonucleotide connectors.

The invention also provides a composition comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides on the first type of nanoparticles have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid or a linking oligonucleotide. The oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid or linking oligonucleotide.

The invention further provides an assembly of containers comprising a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, and a second container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides attached to the nanoparticles in the first container have a sequence

WO 01/01645

PC/DENVER/1199

complementary to that of the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the second container. The oligonucleotides attached to the nanoparticles in the second container have a sequence complementary to that of the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the first container.

5 The invention also provides a nanoparticle having a plurality of different oligonucleotides attached to it.

The invention further provides a method of separating a selected nucleic acid having at least two portions from other nucleic acids. The method comprises providing one or more types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides on each of the types of nanoparticles having a sequence complementary to the sequence of one of the portions of the selected nucleic acid. The selected nucleic acid and other nucleic acids are contacted with the nanoparticles under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the selected nucleic acid so that the nanoparticles hybridized to the
13 selected nucleic acid aggregate and precipitate.

In addition, the invention provides methods of making unique nanoparticle-oligonucleotide conjugates. The first such method comprises binding oligonucleotides to charged nanoparticles to produce stable nanoparticle-oligonucleotide conjugates. To do so, oligonucleotides having covalently bound thereto a moiety comprising a functional group which can bind to the nanoparticles are contacted with the nanoparticles in water for a time sufficient to allow at least some of the oligonucleotides to bind to the nanoparticles by means of the functional groups. Next, at least one salt is added to the water to form a salt solution. The ionic strength of the salt solution must be sufficient to overcome at least partially the electrostatic repulsion of the oligonucleotides from each other and, either the electrostatic attraction of the negatively-charged oligonucleotides for positively-charged nanoparticles, or the electrostatic repulsion of the negatively-charged oligonucleotides from negatively-charged nanoparticles. After adding the salt, the oligonucleotides and nanoparticles are incubated in the salt solution for an additional
30 period of time sufficient to allow sufficient additional oligonucleotides to bind to the nanoparticles to produce the stable nanoparticle-oligonucleotide conjugates. The

WU 01/01/05

PC7USUR0110

invention also includes the stable nanoparticle-oligonucleotide conjugates, methods of using the conjugates to detect and separate nucleic acids, kits comprising the conjugates, methods of microfabrication using the conjugates, and nanomaterials and nanostructures comprising the conjugates.

- 5 The invention provides another method of binding oligonucleotides to nanoparticles to produce nanoparticle-oligonucleotide conjugates. The method comprises providing oligonucleotides, the oligonucleotides comprising a type of recognition oligonucleotides and a type of diluent oligonucleotides. The oligonucleotides and the nanoparticles are contacted under conditions effective to
- 10 allow at least some of each of the types of oligonucleotides to bind to the nanoparticles to produce the conjugates. The invention also includes the nanoparticle-oligonucleotide conjugates produced by this method, methods of using the conjugates to detect and separate nucleic acids, kits comprising the conjugates, methods of microfabrication using the conjugates, and nanomaterials and nanostructures comprising the conjugates. "Recognition oligonucleotides" are oligonucleotides which comprise a sequence complementary to at least a portion of the sequence of a nucleic acid or oligonucleotide target. "Diluent oligonucleotides" may have any sequence which does not interfere with the ability of the recognition oligonucleotides to be bound to the nanoparticles or to bind to their targets.
- 20 The invention provides yet another method of binding oligonucleotides to nanoparticles to produce nanoparticle-oligonucleotide conjugates. The method comprises providing oligonucleotides, the oligonucleotides comprising at least one type of recognition oligonucleotides. The recognition oligonucleotides comprise a recognition portion and a spacer portion. The recognition portion of the recognition oligonucleotides has a sequence complementary to at least one portion of the sequence of a nucleic acid or oligonucleotide target. The spacer portion of the recognition oligonucleotides is designed so that it can bind to the nanoparticles. As a result of the binding of the spacer portion of the recognition oligonucleotide to the nanoparticles, the recognition portion is spaced away from the surface of the nanoparticles and is more accessible for hybridization with its target. To make the
- 30 conjugates, the oligonucleotides, including the recognition oligonucleotides, and the

WU 040665

ECTES/EN/176

nanoparticles are contacted under conditions effective allow at least some of the recognition oligonucleotides to bind to the nanoparticles. The invention also includes the nanoparticle-oligonucleotide conjugates produced by this method, methods of using the conjugates to detect and separate nucleic acids, kits comprising the conjugates, methods of nanofabrication using the conjugates, and nanomaterials and nanostructures comprising the conjugates.

The invention comprises a method of attaching oligonucleotides to nanoparticles by means of a linker comprising a cyclic disulfide. Suitable cyclic disulfides have 5 or 6 atoms in their rings, including the two sulfur atoms. Suitable cyclic disulfides are available commercially. The reduced form of the cyclic disulfides can also be used. Preferably, the linker further comprises a hydrocarbon moiety attached to the cyclic disulfide. Suitable hydrocarbons are available commercially, and are attached to the cyclic disulfides, e.g., as described in the Appendix. Preferably the hydrocarbon moiety is a steroid residue. The linkers are attached to the oligonucleotides and the oligonucleotide-linkers are attached to nanoparticles as described herein.

As used herein, a "type of oligonucleotides" refers to a plurality of oligonucleotide molecules having the same sequence. A "type of nanoparticles, conjugates, particles, latex microspheres, etc. having oligonucleotides attached thereto" refers to a plurality of that item having the same type(s) of oligonucleotides attached to them. "Nanoparticles having oligonucleotides attached thereto" are also sometimes referred to as "nanoparticle-oligonucleotide conjugates" or, in the case of the detection methods of the invention, "nanoparticle-oligonucleotide probes," "nanoparticle probes," or just "probes."

BRIEF DESCRIPTION OF THE DRAWINGS

Figure 1: Schematic diagram illustrating the formation of nanoparticle aggregates by combining nanoparticles having complementary oligonucleotides attached to them, the nanoparticles being held together in the aggregates as a result of the hybridization of the complementary oligonucleotides. X represents any covalent anchor (such as $-S(CH_2)_5OP(O)(O^-)_2$, where S is joined to a gold nanoparticle). For

WG 015165

PC735H0179

the rule of simplicity in Figure 1 and some subsequent figures, only one oligonucleotide is shown to be attached to each particle but, in fact, each particle has several oligonucleotides attached to it. Also, it is important to note that in Figure 1 and subsequent figures, the relative sizes of the gold nanoparticles and the oligonucleotides are not drawn to scale.

Figure 2: Schematic diagram illustrating a system for detecting nucleic acid using nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides on the two nanoparticles have sequences complementary to two different portions of the single-stranded DNA shown. As a consequence, they hybridize to the DNA producing detectable changes (forming aggregates and producing a color change).

Figure 3: Schematic diagram of a variation of the system shown in Figure 2. The oligonucleotides on the two nanoparticles have sequences complementary to two different portions of the single-stranded DNA shown which are separated by a third portion which is not complementary to the oligonucleotides on the nanoparticles.

Also shown is an optional filler oligonucleotide which can be used to hybridize with the noncomplementary portion of the single-stranded DNA. When the DNA, nanoparticles and filler oligonucleotides are combined, the nanoparticles aggregate, with the formation of nicked, double-stranded oligonucleotide complexes.

Figure 4: Schematic diagram illustrating reversible aggregation of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto as a result of hybridization and de-hybridization with a linking oligonucleotide. The illustrated linking oligonucleotide is a double-stranded DNA having overhanging terminal (sticky ends) which are complementary to the oligonucleotides attached to the nanoparticles.

Figure 5: Schematic diagram illustrating the formation of nanoparticle aggregates by combining nanoparticles having oligonucleotides attached thereto with linking oligonucleotides having sequences complementary to the oligonucleotides attached to the nanoparticles.

Figure 6: Curvettes containing two types of gold colloids, each having a different oligonucleotide attached thereto and a linking double-stranded oligonucleotide with sticky ends complementary to the oligonucleotides attached to the nanoparticles (see Figure 4). Curvette A - at 80°C, which is above the T_m of the

WU 0051155

PCT/DK00/011916

linking DNA, de-hybridized (thermally denatured). The color is dark red. Cuvette B - after cooling to room temperature, which is below the T_m of the linking DNA; hybridization has taken place, and the nanoparticles have aggregated, but the aggregates have not precipitated. The color is purple. Cuvette C - after several hours at room temperature, the aggregated nanoparticles have settled to the bottom of the cuvette. The solution is clear, and the precipitate is pinkish gray. Heating B or C will result in A.

Figure 2: A graph of absorbance versus wavelength in nm showing changes in absorbance when gold nanoparticles having oligonucleotides attached thereto aggregate due to hybridization with linking oligonucleotides upon lowering of the temperature, as illustrated in Figure 4.

Figures 5A-B: Figure 5A is a graph of change in absorbance versus temperature/time for the system illustrated in Figure 4. At low temperatures, gold nanoparticles having oligonucleotides attached thereto aggregate due to hybridization with linking oligonucleotides (see Figure 4). At high temperature (80°C), the nanoparticles are de-hybridized. Changing the temperature over time shows that this is a reversible process. Figure 5B is a graph of change in absorbance versus temperature/time performed in the same manner using an aqueous solution of unmodified gold nanoparticles. The reversible changes seen in Figure 5A are not observed.

Figures 5A-B: Transmission Electron Microscope (TEM) images. Figure 5A is a TEM image of aggregated gold nanoparticles held together by hybridization of the oligonucleotides on the gold nanoparticles with linking oligonucleotides. Figure 5B is a TEM image of a two-dimensional aggregate showing the ordering of the linked nanoparticles.

Figure 10: Schematic diagram illustrating the formation of thermally-stable triple-stranded oligonucleotide connectors between nanoparticles having the pyrimidine-purine-pyrimidine motif. Such triple-stranded connectors are stiffer than double-stranded connectors. In Figure 10, one nanoparticle has an oligonucleotide attached to it which is composed of all purines, and the other nanoparticle has an oligonucleotide attached to it which is composed of all pyrimidines. The third

WU 045165

CCTRUHUI 10

oligonucleotide for forming the triple-stranded connector (not attached to a nanoparticle) is composed of pyrimidines.

Figure 11: Schematic diagram illustrating the formation of nanoparticle aggregates by combining nanoparticles having complementary oligonucleotides attached to them, the nanoparticles being held together in the aggregates as a result of the hybridization of the complementary oligonucleotides. In Figure 11, the circles represent the nanoparticles, the formulas are oligonucleotide sequences, and s is the thio-alkyl linker. The multiple oligonucleotides on the two types of nanoparticles can hybridize to each other, leading to the formation of an aggregate structure.

Figure 12A-E: Schematic diagrams illustrating systems for detecting nucleic acid using nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. Oligonucleotide-nanoparticle conjugates 1 and 2 and single-stranded oligonucleotide targets 3, 4, 5, 6 and 7 are illustrated. The circles represent the nanoparticles, the formulas are oligonucleotide sequences, and the dotted and dashed lines represent connecting links of nucleotide.

Figures 13A-B: Schematic diagrams illustrating systems for detecting DNA (analyte DNA) using nanoparticles and a transparent substrate.

Figures 14A-B: Figure 14A is a graph of absorbance versus wavelength in nm showing changes in absorbance when gold nanoparticles having oligonucleotides attached thereto (one population of which is in solution and one population of which is attached to a transparent substrate as illustrated in Figure 13B) aggregate due to hybridization with linking oligonucleotides. Figure 14B is a graph of change in absorbance for the hybridized system referred to in Figure 14A, as the temperature is increased (melting).

Figure 15A-C: Schematic diagrams illustrating systems for detecting nucleic acid using nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. Oligonucleotide-nanoparticle conjugates 1 and 2 and single-stranded oligonucleotide targets 3, 4, 5, 6, 7 and 8 are illustrated. The circles represent the nanoparticles, the formulas are oligonucleotide sequences, and S represents the thio-alkyl linker.

Figure 16A-C: Schematic diagrams illustrating systems for detecting nucleic acid using nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. Oligonucleotide-

WO 03/0565

PCT/US2001/116

nanoparticle conjugates 1 and 2, single-stranded oligonucleotide targets of different lengths, and filter oligonucleotides of different lengths are illustrated. The circles represent the nanoparticles, the formulas are oligonucleotide sequences, and S represents the thio-alkyl linker.

- 5 **Figure 17A-B:** Schematic diagrams illustrating nanoparticle-oligonucleotide conjugates and systems for detecting nucleic acid using nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The circles represent the nanoparticles, the straight lines represent oligonucleotide chains (bases not shown), two closely-spaced parallel lines represent duplex segments, and the small letters indicate specific nucleotide sequences (a is complementary to a', b is complementary to b', etc.).

- 10 **Figure 18:** Schematic diagram illustrating a system for detecting nucleic acid using liposomes (large double circles), nanoparticles (small open circles) and a transparent substrate. The filled-in squares represent cholesterol groups, the squiggles represent oligonucleotides, and the ladders represent double-stranded (hybridized) oligonucleotides.

- 15 **Figure 19A-B:** Figure 19A is a graph of absorbance versus wavelength in nm showing changes in absorbance when gold nanoparticle-oligonucleotide conjugates assemble in multiple layers on a transparent substrate as illustrated in Figure 13A. Figure 19B is a graph of change in absorbance for the hybridized system referred to in Figure 19A as the temperature is increased (method).

- 20 **Figure 20A-B:** Illustrations of schemes using fluorescent-labeled oligonucleotides attached to metallic or semiconductor quenching nanoparticles (Figure 20A) or to non-metallic, non-semiconductor particles (Figure 20B).

- 25 **Figure 21:** Schematic diagram illustrating a system for detecting target nucleic acid using gold nanoparticles having oligonucleotides attached thereto and latex microspheres having fluorescently-labeled oligonucleotides attached thereto. The small, closed, dark circles represent the nanoparticles, the large, open circles represent the latex microspheres, and the large oval represents a microporous membrane.

- 30 **Figure 22:** Schematic diagram illustrating a system for detecting target nucleic acid using two types of fluorescently-labeled oligonucleotide-nanoparticle

WU 085165

PC T288181 P01

conjugates. The closed circles represent the nanoparticles, and the large oval represents a microporous membrane.

Figure 23: Sequences of materials utilized in an assay for Anthrax Protective Antigen (see Example 12).

Figure 24: Schematic diagram illustrating a system for detecting target nucleic acid using a "satellite probe" which competes for nanoparticles (dark spheres) having oligonucleotides (straight lines) attached to them, probe oligonucleotides (wavy lines) hybridized to the oligonucleotides attached to the nanoparticles, the probe oligonucleotides being labeled with a reporter group (open rectangular box). A, B, C, A', B', and C' represent specific nucleotide sequences, with A, B and C being complementary to A', B' and C', respectively.

Figure 25A-B: Schematic diagrams illustrating systems for detecting DNA using nanoparticles and a transparent substrate. In these figures, a, b and c refer to different oligonucleotide sequences, and a', b' and c' refer to oligonucleotide sequences complementary to a, b and c, respectively.

Figure 26: Schematic diagram illustrating systems for forming assemblies of CdSe/ZnS core/shell quantum dots (QD).

Figure 27A-D: Figure 27A shows fluorescence spectra comparing dispersed and aggregated QDs, with an excitation at 400 nm. The samples were prepared ideally, except for the addition of complementary "linker" DNA to one and an equal volume and concentration of non-complementary DNA to the other. Figure 27B shows UV-Visible spectra of QD/QD assemblies at different temperatures before, during and after "melting". Figure 27C shows high resolution TEM image of a portion of a hybrid gold/QD assembly. The lattice fringes of the QDs, which resemble fingerprints, appear near each gold nanoparticle. Figure 27D shows UV-Visible spectra of hybrid gold/QD assemblies at different temperatures before, during and after "melting". The insets in Figures 27B and 27D display temperature versus extinction profiles for the thermal denaturation of the assemblies. Denaturation experiments were conducted in 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate buffer (pH 7), 0.01% sodium azide with 13 nm gold nanoparticles and/or ~4 nm CdSe/ZnS core/shell QDs.

WO 01/01665

PC/FUSHI/21/10

FIGURE 20A-E: Schematic diagram illustrating the preparation of core probes, appropriate probes and systems for detecting DNA using these probes. In these figures, a, b, c and d refer to different oligonucleotide sequences, and a', b', c' and d' refer to oligonucleotide sequences complementary to a, b, c and d, respectively.

FIGURE 20: Graph of fractional displacement of oligonucleotides by mercaptopotential from nanoparticles (closed circles) or gold thin films (open squares) to which the oligonucleotides had been attached.

FIGURE 20: Graph of surface coverages of recognition oligonucleotides on nanoparticles obtained for different ratios of recognition:diffuent oligonucleotides used in the preparation of the nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

FIGURE 21: Graph of surface coverages of hybridized complementary oligonucleotides versus different surface coverages of recognition oligonucleotides on nanoparticles.

FIGURE 22: Schematic diagram illustrating system for detecting a target DNA in a four-element assay on a substrate using nanoparticle-oligonucleotide conjugates and amplification with silver staining.

FIGURE 23: Images obtained with a flatbed scanner of 7 mm x 13 mm oligonucleotide-functionalized Dint glass slides. (A) Slides before hybridization of DNA target and gold nanoparticle-oligonucleotide indicator conjugate. (B) Slide A after hybridization of 10 nM target DNA and 5 nM nanoparticle-oligonucleotide indicator conjugate. A pink color was imparted by attachment, red 13 nm diameter gold nanoparticles. (C) Slide B after exposure to silver amplification solution for 5 minutes. (D) Same as (A). (E) Slide D after hybridization of 100 pM target and 5 nM nanoparticle-oligonucleotide indicator conjugate. The absorbance of the nanoparticle layer was too low to be observed with the naked eye or flatbed scanner. (F) Slide E after exposure to silver amplification solution for 5 minutes. Note that slide F is much lighter than slide C, indicating lower target concentration. (G) Control slide, exposed to 5 nM nanoparticle-oligonucleotide indicator conjugate and exposed to silver amplification solution for 5 minutes. No darkening of the slide was observed.

FIGURE 23: Graph of grayscale (optical density) of oligonucleotide-functionalized glass surface exposed to varying concentrations of target DNA.

WD 010165

PCT/JP00/0190

followed by 5 nM gold of nanoparticle-oligonucleotide indicator conjugate and silver amplification for 5 minutes.

Figure 35A-B: Graphs of percent hybridized label versus temperature showing dissociation of fluorophore-labeled (Figure 35A) and nanoparticle-labeled (Figure 35B) targets from an oligonucleotide-functionalized glass surface.

Measurements were made by measuring fluorescence (Figure 35A) or absorbance (Figure 35B) of dissociated label in the solution above the glass surface. The lines labeled "9" show the dissociation curves for perfectly matched oligonucleotides on the glass, and the lines labeled "4" show curves for mismatched oligonucleotides (a one-base mismatch) on the glass. Vertical lines in the graphs illustrate the fraction of target dissociated at a given temperature (halfway between the melting temperatures T_m of each curve) for each measurement, and the expected selectivity of sequence identification for fluorophore- and nanoparticle-based gene chips. Fluorescence (Figure 35A): complement (69%) / mismatch (38%) = 1.8:1. Absorbance (Figure 35B): complement (85%) / mismatch (14%) = 6:1. The breadth of the fluorophore-labeled curves (Figure 35A) is characteristic of the dissociation of fluorophore-labeled targets from gene chips (Formis et al., in *Molecular Modeling of Nucleic Acids*, Lemtis et al., eds., (ACS Symposium Series 682, American Chemical Society, Washington D.C., 1998), pages 206-228).

Figure 36A-B: Images of model oligonucleotide arrays challenged with synthetic target and fluorocenter-labeled (Figure 36A) or nanoparticle-labeled (Figure 36B) nanoparticle-oligonucleotide conjugate probes. C, A, T, and G represent spots (elements) on the array where a single base change has been made in the oligonucleotide attached to the substrate to give a perfect match with the target (base A) or a single base mismatch (base C, T or G in place of the perfect match with base A). The grayscale ratio for elements C:A:T:G is 9:37:9:11 for Figure 36A and 2:62:7:34 for Figure 36B.

Figure 37: Schematic diagram illustrating system for forming aggregates (A) or layers (B) of nanoparticles (a and b) linked by a linking nucleic acid (X).

Figure 38A: UV-visible spectra of alternating layers of gold nanoparticles a and b (see Figure 37) hybridized to an oligonucleotide-functionalized glass

WU 61/01665

FCTAUS61/1790

microscope slide via the complementary linker: 3. The spectra are for assemblies with 1 (a, $\lambda_{max} = 526$ nm), 2 (b, $\lambda_{max} = 529$ nm), 3 (c, $\lambda_{max} = 532$ nm), 4 (d, $\lambda_{max} = 534$ nm) or 5 (e, $\lambda_{max} = 534$ nm) layers. These spectra were measured directly through the slide.

Figure 38B: Graph of absorbance for nanoparticle assemblies (see Figure 38A) at λ_{max} with increasing numbers of layers.

Figures 39A-E: Figures 39A: FE-SEM of one layer of oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles cohybridized with DNA linker to an oligonucleotide-functionalized, conductive indium-tin-oxide (ITO) slide (prepared in the same way as oligonucleotide-functionalized glass slide). The visible absorbance spectrum of this slide was identical to Figure 38A, indicating that functionalization and nanoparticle coverage on ITO is similar to that on glass. The average density of coated nanoparticles from 10 such images was approximately 800

nanoparticles/ μm^2 . Figure 39B: FE-SEM image of two layers of nanoparticles on the ITO slide. The average density of coated nanoparticles from 10 such images was approximately 2800 particles/ μm^2 . Figure 39C: Absorbance at 260 nm (A_{260})

showing dissociation of a 0.5 μM solution of the oligonucleotide duplex (1 + 2 + 3, see Figure 37, A) to single strands in 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate buffer solution (pH 7). Figures 39D-F: Absorbance at 260 nm (A_{260}) showing dissociation of 1 layer

(Figure 39D), 4 layers (Figure 39E) and 10 layers (Figure 39F) of oligonucleotide-functionalized gold nanoparticles from glass slides immersed in 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate buffer solution. Melting profiles were obtained by measuring the decreasing absorbance at 520 nm (A_{520}) through the slides with increasing temperature. In each of Figures 39D-F, the insets show the first derivatives of the measured dissociation curves. FWHM of these curves were (Figure 39C inset) 13.2 $^{\circ}C$, (Figure 39D inset) 5.6 $^{\circ}C$, (Figure 39E inset) 3.2 $^{\circ}C$, and (Figure 39F inset) 2.9 $^{\circ}C$.

Figure 40: Schematic diagram illustrating systems used to measure the electrical properties of gold nanoparticle assemblies linked by DNA. For simplicity, only one hybridization event is drawn.

Figure 41: Schematic diagram illustrating a method of detecting nucleic acid using gold electrodes and gold nanoparticles.

WO 00/51165

PC/DUSH/01150

- Figure 42: Schematic diagram illustrating the structures of a cyclic disulfide 1, including the preferred compound 1, having a steroid moiety for use in linking oligonucleotides to nanoparticles. The steroid disulfide molecule was obtained by condensation of 4,5-dihydroxy-1,2-dithiane with epandrosterone. Gold nanoparticle-oligonucleotide conjugates were prepared using oligonucleotides modified with the steroid disulfide exhibit greater stability towards DTT relative to those nanoparticle-oligonucleotides that employ oligonucleotide-maleimide linkers for their preparation.

- Figure 43: Schematic diagram for the synthesis and formulas for the steroid cyclic disulfide anchor group.

- Figure 44: Schematic diagram illustrating cyclic disulfides of formulas 2 for use in preparing oligonucleotide-cyclic disulfide linkers as described in Example 24, and some related cyclic disulfides for use as anchor groups.

- Figure 45: Schematic diagram illustrating the structures described in Example 25. Figure 45(a) illustrates the structures of 5'-monofluor modified oligonucleotide 5, a 35-base 5'-steroid disulfide oligomer 6 and Trembler phosphoramide 7 and 5'-thio-mercaptolinked oligonucleotide 8.

- Figure 46: Schematic diagram illustrating the chemistry of making a novel tri-thiol oligonucleotide.

WU 418365

PCT/US98/01190

DETAILED DESCRIPTION OF THE PRESENTLY PREFERRED EMBODIMENTS

Nanoparticles useful in the practice of the invention include metal (e.g., gold, silver, copper and platinum), semiconductor (e.g., CdSe, CdS, and Cds or CdSe coated with ZnS) and magnetic (e.g., ferromagnetic) colloidal materials. Other nanoparticles useful in the practice of the invention include ZnS, ZnO, TiO₂, AgI, AgBr, HgI₂, PbS, PbSe, ZnTe, CdTe, In₂Se₃, In₂S₃, Cd₃P₂, CdAs₂, InAs, and GaAs. The size of the nanoparticles is preferably from about 5 nm to about 150 nm (mean diameter), more preferably from about 5 to about 50 nm, most preferably from about 10 to about 30 nm. The nanoparticles may also be rods.

Methods of making metal, semiconductor and magnetic nanoparticles are well-known in the art. See, e.g., Schmid, G. (ed.) *Clusters and Colloids* (VCH, Weinheim, 1994); Hayat, M.A. (ed.) *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications* (Academic Press, San Diego, 1991); Massart, R., *IEEE Transactions On Magnetics*, 17, 1247 (1981); Almadi, T.S. et al., *Science*, 272, 1924 (1996); Henglein, A. et al., *J. Phys. Chem.*, 99, 14129 (1995); Curll, A.C., et al., *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 27, 1530 (1988).

Methods of making ZnS, ZnO, TiO₂, AgI, AgBr, HgI₂, PbS, PbSe, ZnTe, CdTe, In₂Se₃, In₂S₃, Cd₃P₂, CdAs₂, InAs, and GaAs nanoparticles are also known in the art. See, e.g., Weller, *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.*, 32, 41 (1993); Henglein, *Top. Curr. Chem.*, 143, 113 (1988); Henglein, *Chem. Rev.*, 89, 1861 (1989); Brun, *Appl. Phys. A*, 53, 465 (1991); Balazs, in *Photochemical Conversion and Storage of Solar Energy* (eds. Pelizzetti and Schiavetto 1991), page 251; Wang and Hemon, *J. Phys. Chem.*, 96, 525 (1991); Othavsky et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 112, 9438 (1990); Ushida et al., *J. Phys. Chem.*, 95, 5382 (1992).

Suitable nanoparticles are also commercially available from, e.g., Ted Pella, Inc. (gold), Amersham Corporation (gold) and Nanoprobes, Inc. (gold).

Presently preferred for use in detecting nucleic acids are gold nanoparticles. Gold colloidal particles have high extinction coefficients for the bands that give rise to their beautiful colors. These intense colors change with particle size, concentration, interparticle distance, and extent of aggregation and shape (geometry).

WO 02/01165

C/T2002081990

of the aggregates, making these materials particularly attractive for colorimetric assays. For instance, hybridization of oligonucleotides attached to gold nanoparticles with oligonucleotides and nucleic acids results in an immediate color change visible to the naked eye (see, e.g., the Examples).

- 5 Gold nanoparticles are also presently preferred for use in nanofabrication for the same reasons given above and because of their stability, ease of imaging by electron microscopy, and well-characterized modification with thiol functionalities (see below). Also preferred for use in nanofabrication are semiconductor nanoparticles because of their unique electronic and luminescent properties.
- 10 The nanoparticles, the oligonucleotides or both are functionalized in order to attach the oligonucleotides to the nanoparticles. Such methods are known in the art. For instance, oligonucleotides functionalized with alcohols at their 3'-termini or 5'-termini readily attach to gold nanoparticles. See Whitelander, *Proceedings of the Robert A. Welch Foundation 39th Conference On Chemical Research Nanoplate Chemistry*, Houston, TX, pages 109-121 (1995). See also, Mucic et al. *Chem.*
- 15 *Commun.* 555-557 (1996) (describes a method of attaching 3' thiol DNA to flat gold surfaces; this method can be used to attach oligonucleotides to nanoparticles). The alkylthiol method can also be used to attach oligonucleotides to other metal, semiconductor and magnetic colloids and to the other nanoparticles listed above.
- 20 Other functional groups for attaching oligonucleotides to solid surfaces include phosphorodiamate groups (see, e.g., U.S. Patent No. 5,472,881 for the binding of oligonucleotide-phosphorothioates to gold surfaces), substituted alkylsiloxanes (see, e.g., Duvell, *Chemical Technology*, 4, 370-377 (1974) and Matsumoto and Camthers, *J. Am. Chem. Soc.*, 103, 3185-3191 (1981) for binding of oligonucleotides to silica and glass surfaces, and Gruber et al., *Anal. Chem.*, 67, 735-743 for binding of aminosilyloxanes and for similar binding of mercaptosilyloxanes).
- 25 Oligonucleotides terminated with a 5' thiosuccinimide or a 3' thiosuccinimide may also be used for attaching oligonucleotides to solid surfaces. The following references describe other methods which may be employed to attach oligonucleotides to nanoparticles: Nuzzo et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 2358 (1987) (disulfides on gold),
- 30 Aliza and Nuzzo, *Langmuir*, 1, 45 (1985) (carboxylic acids on aluminum); Aliza

WO 93/03165

PCT/US93/01290

- and Tompkins, *J. Colloid Interface Sci.*, **49**, 410-421 (1974) (carboxylic acids on copper); Eir, *The Chemistry of Silica*, Chapter 6, (Wiley 1979) (carboxylic acids on silica); Timmons and Zisman, *J. Phys. Chem.*, **69**, 584-590 (1965) (carboxylic acids on platinum); Soraggi and Hubbard, *J. Am. Chem. Soc.*, **104**, 3937 (1982) (aromatic ring compounds on platinum); Hebbaut, *Acc. Chem. Res.*, **13**, 177 (1980) (sulfonates, sulfoxides and other functionalized solvents on platinum); Hickman et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **111**, 7271 (1989) (nanotubes on platinum); Mertz and Saghy, *Langmuir*, **3**, 1045 (1987) (silanes on silica); Mertz and Saghy, *Langmuir*, **3**, 1034 (1987) (silanes on silica); Wasserman et al., *Langmuir*, **5**, 1074 (1989) (silanes on silica); Elshova and Elsheikh, *Langmuir*, **3**, 951 (1987) (aromatic carboxylic acids, aldehydes, alcohols and methoxy groups on titanium dioxide and silica); Lee et al., *J. Phys. Chem.*, **93**, 2397 (1988) (rigid phosphates on metals)

Oligonucleotides functionalized with a cyclic disulfide are within the scope of this invention. The cyclic disulfides preferably have 5 or 6 atoms in their rings, including the two sulfur atoms. Suitable cyclic disulfides are available commercially or may be synthesized by known procedures. The reduced form of the cyclic disulfides can also be used.

- Preferably, the linker further comprises a hydrocarbon moiety attached to the cyclic disulfide. Suitable hydrocarbons are available commercially, and are attached to the cyclic disulfide. Preferably the hydrocarbon moiety is a steroid residue. Oligonucleotide-nanoparticle conjugates prepared using linkers comprising a steroid residue attached to a cyclic disulfide have unexpectedly been found to be remarkably stable to thiols (e.g., dithiothreitol used in polymerase chain reaction (PCR) solutions) as compared to conjugates prepared using alkanethiols or acyclic disulfides as the linker. Indeed, the oligonucleotide-nanoparticle conjugates of the invention have been found to be 300 times more stable. This unexpected stability is likely due to the fact that each oligonucleotide is anchored to a nanoparticle through two sulfur atoms, rather than a single sulfur atom. In particular, it is thought that two adjacent sulfur atoms of a cyclic disulfide would have a chelation effect which would be advantageous in stabilizing the oligonucleotide-nanoparticle conjugates. The large hydrophobic steroid residues of the linkers also appear to contribute to the stability of

WO 01/5165

PC/US/01/01790

the conjugates by accelerating the nanoparticles from the approach of water-soluble molecules to the surfaces of the nanoparticles.

In view of the foregoing, the two sulfur atoms of the cyclic disulfide should preferably be close enough together so that both of the sulfur atoms can attach simultaneously to the nanoparticle. Most preferably, the two sulfur atoms are adjacent each other. Also, the hydrocarbon moiety should be large so as to present a large hydrophobic surface screening the surfaces of the nanoparticles.

The oligonucleotide-cyclic nanoparticle conjugates that employ cyclic disulfide linkers may be used as probes in diagnostic assays for detecting nucleic acids or in methods of nanofabrication as described herein. These conjugates according to the present invention have unexpectedly been found to improve the sensitivity of diagnostic assays in which they are used. In particular, assays employing oligonucleotide-nanoparticle conjugates prepared using linkers comprising a steroid residue attached to a cyclic disulfide have been found to be about 10 times more sensitive than assays employing conjugates prepared using alkanebiols or acyclic disulfides as the linker.

The surprising stability of the resulting oligonucleotide-nanoparticle conjugates of the invention to thiols described above allows them to be used directly in PCR solutions. Thus, oligonucleotide-nanoparticle conjugates of the invention added as probes to a DNA target to be amplified by PCR can be carried through the 30 or 40 heating-cooling cycles of the PCR and are still able to detect the amplicons without opening the tubes. Opening the sample tubes for addition of probes after PCR can cause serious problems through contamination of the equipment to be used for subsequent tests.

Finally, the invention provides kits comprising a container holding a type of oligonucleotide-cyclic disulfide linkers of the invention or a container holding a type of oligonucleotide-nanoparticle conjugates of the invention. The kits may also contain other reagents and items useful for detecting nucleic acids or for nanofabrication.

WO 01/01555

PC/T/00/001792

Each nanoparticle will have a plurality of oligonucleotides attached to it. As a result, each nanoparticle-oligonucleotide conjugate can bind to a plurality of oligonucleotides or nucleic acids having the complementary sequence.

- Oligonucleotides of defined sequences are used for a variety of purposes in the practice of the invention. Methods of making oligonucleotides of a predetermined sequence are well known. See, e.g., Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989) and F. Eckstein (ed.) *Oligonucleotides and Analogues*, 1st Ed. (Oxford University Press, New York, 1991). Solid-phase synthesis methods are preferred for both oligribonucleotides and oligodeoxynucleotides (the well-known methods of synthesizing DNA are also useful for synthesizing RNA). Oligoribonucleotides and oligodeoxynucleotides can also be prepared enzymatically.

- The invention provides methods of detecting nucleic acids. Any type of nucleic acid may be detected, and the methods may be used, e.g., for the diagnosis of disease and in sequencing of nucleic acids. Examples of nucleic acids that can be detected by the methods of the invention include genes (e.g., a gene associated with a particular disease), viral RNA and DNA, bacterial DNA, fungal DNA, cDNA, mRNA, RNA and DNA fragments, oligonucleotides, synthetic oligonucleotides, modified oligonucleotides, single-stranded and double-stranded nucleic acids, natural and synthetic nucleic acids, etc. Then, examples of the uses of the methods of detecting nucleic acids include: the diagnosis and/or monitoring of viral diseases (e.g., human immunodeficiency virus, hepatitis viruses, herpes viruses, cytomegalovirus, and Epstein-Barr virus), bacterial diseases (e.g., tuberculosis, Lyme disease, *H. pylori*, *Escherichia coli* infections, *Legionella* infections, *Mycoplasma* infections, *Salmonella* infections), sexually transmitted diseases (e.g., gonorrhea), inherited disorders (e.g., cystic fibrosis, Duchenne muscular dystrophy, phenylketonuria, sickle cell anemia), and cancers (e.g., genes associated with the development of cancer); in forensics; in DNA sequencing; for paternity testing; for cell line authentication; for monitoring gene therapy; and for many other purposes.
- The methods of detecting nucleic acids based on observing a color change with the naked eye are cheap, fast, simple, robust (the reagents are stable), do not

WG 4351165

PC77US0601150

require specialized or expensive equipment, and little or no instrumentation is required. This makes them particularly suitable for use in, e.g., research and analytical laboratories in DNA sequencing, in the field to detect the presence of specific pathogens, in the doctor's office for quick identification of an infection to assist in prescribing a drug for treatment, and in homes and health centers for inexpensive first-line screening.

The nucleic acid to be detected may be isolated by known methods, or may be detected directly in cells, tissue samples, biological fluids (e.g., saliva, urine, blood, serum), solutions containing PCR components, solutions containing large excesses of oligonucleotides or high molecular weight DNA, and other samples, as also known in the art. See, e.g., Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989) and B.D. Hames and S.J. Higgins, Eds., *Gene Probes I* (IRL Press, New York, 1995). Methods of preparing nucleic acids for detection with hybridizing probes are well known in the art. See, e.g., Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989) and B.D. Hames and S.J. Higgins, Eds., *Gene Probes I* (IRL Press, New York, 1995).

If a nucleic acid is present in small amounts, it may be amplified by methods known in the art. See, e.g., Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989) and B.D. Hames and S.J. Higgins, Eds., *Gene Probes I* (IRL Press, New York, 1995). Preferred is polymerase chain reaction (PCR) amplification.

One method according to the invention for detecting nucleic acid comprises contacting a nucleic acid with one or more types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The nucleic acid to be detected has at least two portions. The lengths of these portions and the distance(s), if any, between them are chosen so that when the oligonucleotides on the nanoparticles hybridize to the nucleic acid, a detectable change occurs. These lengths and distances can be determined empirically and will depend on the type of particle used and its size and the type of electrolyte which will be present in solutions used in the assay (as is known in the art, certain electrolytes affect the conformation of nucleic acids).

Also, when a nucleic acid is to be detected in the presence of other nucleic acids, the portions of the nucleic acid to which the oligonucleotides on the

WO 00/51645

PC/DEN/RT/190

nanoparticles are to bind must be chosen so that they contain sufficient unique sequence so that detection of the nucleic acid will be specific. Guidelines for doing so are well known in the art.

- Although nucleic acids may contain repeating sequences close enough to each other so that only one type of oligonucleotide-nanoparticle conjugate need be used, this will be a rare occurrence. In general, the chosen portions of the nucleic acid will have different sequences and will be contacted with nanoparticles carrying two or more different oligonucleotides, preferably attached to different nanoparticles. An example of a system for the detection of nucleic acid is illustrated in Figure 2. As can be seen, a first oligonucleotide attached to a first nanoparticle has a sequence complementary to a first portion of the target sequence in the single-stranded DNA. A second oligonucleotide attached to a second nanoparticle has a sequence complementary to a second portion of the target sequence in the DNA. Additional portions of the DNA could be targeted with nonresponding nanoparticles. See Figure 17. Targeting several portions of a nucleic acid increases the magnitude of the detectable change.

- The contacting of the nanoparticle-oligonucleotide conjugates with the nucleic acid takes place under conditions effective for hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the target sequence(s) of the nucleic acid. These

- hybridization conditions are well known in the art and can readily be optimized for the particular system employed. See, e.g., Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2nd ed. 1989). Preferably stringent hybridization conditions are employed.

- Fast hybridization can be obtained by freezing and thawing a solution containing the nucleic acid to be detected and the nanoparticle-oligonucleotide conjugates. The solution may be frozen in any convenient manner, such as placing it in a dry ice-alcohol bath for a sufficient time for the solution to freeze (generally about 1 minute for 100 μ L of solution). The solution must be thawed at a temperature below the thermal denaturation temperature, which can conveniently be room temperature for most combinations of nanoparticle-oligonucleotide conjugates and

WO 01/51655

PCT/US98/0190

nucleic acids. The hybridization is complete, and the detectable change may be observed, after thawing the solution.

- The rate of hybridization can also be increased by warming the solution containing the nucleic acid to be detected and the nanoparticle-oligonucleotide conjugates to a temperature below the dissociation temperature (T_m) for the complex formed between the oligonucleotides on the nanoparticles and the target nucleic acid. Alternatively, rapid hybridization can be achieved by heating above the dissociation temperature (T_m) and allowing the solution to cool.

- The rate of hybridization can also be increased by increasing the salt concentration (e.g., from 0.1 M to 0.3 M NaCl).

- The detectable change that occurs upon hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to the nucleic acid may be a color change, the formation of aggregates of the nanoparticles, or the precipitation of the aggregated nanoparticles. The color changes can be observed with the naked eye or spectroscopically. The formation of aggregates of the nanoparticles can be observed by electron microscopy or by nephelometry. The precipitation of the aggregated nanoparticles can be observed with the naked eye or microscopically. Preferred are changes observable with the naked eye. Particularly preferred is a color change observable with the naked eye.

- The observation of a color change with the naked eye can be made more readily against a background of a contrasting color. For instance, when gold nanoparticles are used, the observation of a color change is facilitated by spotting a sample of the hybridization solution on a solid white surface (such as silica or alumina TLC plates, filter paper, cellulose nitrate membranes, and nylon membranes, preferably a C-18 silica TLC plate) and allowing the spot to dry. Initially, the spot retains the color of the hybridization solution (which ranges from pink/red, in the absence of hybridization, to purple/red/purple, if there has been hybridization). On drying at room temperature or 80°C (temperature is not critical), a blue spot develops if the nanoparticle-oligonucleotide conjugates had been linked by hybridization with the target nucleic acid prior to spotting. In the absence of hybridization (e.g., because no target nucleic acid is present), the spot is pink. The blue and the pink spots are

WU 0151155

PCT/US00/01301

stable and do not change on subsequent cooling or heating or over time. They provide a convenient permanent record of the test. No other steps (such as a separation of hybridized and unhybridized nanoparticle-oligonucleotide conjugates) are necessary to observe the color change.

- 5 An alternate method for easily visualizing the assay results is to spot a sample of nanoparticle probes hybridized to a target nucleic acid on a glass fiber filter (e.g., Bioassess Microfilter Filter, 8.7 micron pore size, grade FG75, for use with gold nanoparticles 13 nm in size), while drawing the liquid through the filter. Subsequent rinsing with water washes the excess, non-hybridized probes through the filter, leaving behind an observable spot comprising the aggregates generated by hybridization of the nanoparticle probes with the target nucleic acid (retained because these aggregates are larger than the pores of the filter). This technique may provide for greater sensitivity, since an excess of nanoparticle probes can be used.
- 10 Unfortunately, the nanoparticle probes stick to many other solid surfaces that have been tried (silica slides, reverse-phase plates, and nylon, nitrocellulose, cellulose and other membranes), and these surfaces cannot be used.

- An important aspect of the detection system illustrated in Figure 2 is that obtaining a detectable change depends on cooperative hybridization of two different oligonucleotides to a given target sequence in the nucleic acid. Mismatches in either of the two oligonucleotides will destabilize the interparticle connection. It is well known that a mismatch in base pairing has a much greater destabilizing effect on the binding of a short oligonucleotide probe than on the binding of a long oligonucleotide probe. The advantage of the system illustrated in Figure 2 is that it utilizes the base discrimination associated with a long target sequence and probe (eighteen base-pairs in the example illustrated in Figure 2), yet has the sensitivity characteristic of a short oligonucleotide probe (nine base-pairs in the example illustrated in Figure 2).
- 25 The target sequence of the nucleic acid may be contiguous, as in Figure 2, or the two portions of the target sequence may be separated by a third portion which is not complementary to the oligonucleotides on the nanoparticles, as illustrated in Figure 3. In the latter case, one has the option of using a filler oligonucleotide which is free in solution and which has a sequence complementary to that of this third

WU 4151465

PC72080110

portion (see Figure 3). When the filter oligonucleotide hybridizes with the third portion of the nucleic acid, a double-stranded segment is created, thereby altering the average distance between the nanoparticles and, consequently, the color. The system illustrated in Figures 3 may increase the sensitivity of the detection method.

- 5 Some embodiments of the method of detecting nucleic acid utilize a substrate. By employing a substrate, the detectable change (the signal) can be amplified and the sensitivity of the assay increased.

Any substrate can be used which allows observation of the detectable change.

- Suitable substrates include transparent solid surfaces (e.g., glass, quartz, plastics and other polymers), opaque solid surfaces (e.g., white solid surfaces, such as TLC silica plates, filter paper, glass fiber filters, cellulose nitrate membranes, nylon membranes), and conducting solid surfaces (e.g., indium-tin-oxide (ITO)). The substrate can be any shape or thickness, but generally will be flat and thin. Preferred are transparent substrates such as glass (e.g., glass slides) or plastics (e.g., wells of microtiter plates).

- 15 In one embodiment, oligonucleotides are attached to the substrate. The oligonucleotides can be attached to the substrates as described in, e.g., Chisley et al., *Nucleic Acids Res.*, 24, 3031-3039 (1996); Chisley et al., *Nucleic Acids Res.*, 24, 3040-3047 (1996); Mazic et al., *Chem. Commun.*, 555 (1996); Zimmermann and Cox, *Nucleic Acids Res.*, 22, 492 (1994); Bottomley et al., *J. Vac. Sci. Technol. A*, 10, 591 (1992); and Hegner et al., *FEBS Lett.*, 336, 452 (1993).

- The oligonucleotides attached to the substrate have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid to be detected. The nucleic acid is contacted with the substrate under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with the nucleic acid. In this manner the nucleic acid becomes bound to the substrate. Any unbound nucleic acid is preferably washed from the substrate before adding nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

- 25 Next, the nucleic acid bound to the substrate is contacted with a first type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid, and the contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid. In this manner the first

WO 01/51065

FIGURES 17-18

type of nanoparticle become bound to the substrate. After the nanoparticle-oligonucleotide conjugates are bound to the substrate, the substrate is washed to remove any unbound nanoparticle-oligonucleotide conjugates and nucleic acid.

The oligonucleotides on the first type of nanoparticles may all have the same sequence or may have different sequences that hybridize with different portions of the nucleic acid to be detected. When oligonucleotides having different sequences are used, each nanoparticle may have all of the different oligonucleotides attached to it or, preferably, the different oligonucleotides are attached to different nanoparticles.

Figure 17 illustrates the use of nanoparticle-oligonucleotide conjugates designed to

- 10 hybridize to multiple portions of a nucleic acid. Alternatively, the oligonucleotides on each of the first type of nanoparticles may have a plurality of different sequences, at least one of which must hybridize with a portion of the nucleic acid to be detected (see Figure 25B).

- Finally, the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates bound to the substrate is contacted with a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. These oligonucleotides have a sequence complementary to at least a portion of the sequence(s) of the oligonucleotides attached to the first type of nanoparticles, and the contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first type of nanoparticles with those on the second type of nanoparticles. After the nanoparticles are bound, the substrate is

- 20 preferably washed to remove any unbound nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

The combination of hybridizations produces a detectable change. The detectable changes are the same as those described above, except that the multiple hybridizations result in an amplification of the detectable change. In particular, since each of the first type of nanoparticles has multiple oligonucleotides (having the same or different sequences) attached to it, each of the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates can hybridize to a plurality of the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. Also, the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates may be hybridized to more than one portion of the nucleic acid to be detected. The amplification provided by the multiple hybridizations may

- 30 make the change detectable for the first time or may increase the magnitude of the

WU 6161665

PC/T/SH/01190

detectable change. This amplification increases the sensitivity of the assay, allowing for detection of small amounts of nucleic acid.

If desired, additional layers of nanoparticles can be built up by successive additions of the first and second types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. In this way, the number of nanoparticles immobilized per molecule of target nucleic acid can be further increased with a corresponding increase in intensity of the signal.

Also, instead of using first and second types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates designed to hybridize to each other directly, nanoparticles bearing oligonucleotides that would serve to bind the nanoparticles together as a consequence of hybridization with binding oligonucleotides could be used.

Methods of making the nanoparticles and the oligonucleotides and of attaching the oligonucleotides to the nanoparticles are described above. The hybridization conditions are well known in the art and can be readily optimized for the particular system employed (see above).

An example of this method of detecting nucleic acid (analyte DNA) is illustrated in Figure 13A. As shown in that Figure, the combination of hybridizations produces dark areas where nanoparticle aggregates are linked to the substrate by analyte DNA. These dark areas may be readily observed with the naked eye using ambient light, preferably viewing the substrate against a white background. As can be readily seen from Figure 13A, this method provides a means of amplifying a detectable change.

Another example of this method of detecting nucleic acid is illustrated in Figure 25B. As in the example illustrated in Figure 13A, the combination of hybridizations produces dark areas where nanoparticle aggregates are linked to the substrate by analyte DNA, which can be observed with the naked eye.

In another embodiment, nanoparticles are attached to the substrate. Nanoparticles can be attached to substrates as described in, e.g., Orlov et al., *Analyt. Chem.*, 67, 73-743 (1995); Beishell et al., *J. Electroanal. Chem.*, 409, 137 (1996); Bar et al., *Langmuir*, 12, 1172 (1996); Coivin et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 3221 (1992).

After the nanoparticles are attached to the substrate, oligonucleotides are attached to the nanoparticles. This may be accomplished in the same manner

WO 01/51165

PCT/US99/110

described above for the attachment of oligonucleotides to nanoparticles in solution. The oligonucleotides attached to the nanoparticles have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid.

- The substrate is contacted with the nucleic acid under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid. In this manner the nucleic acid becomes bound to the substrate. Unbound nucleic acid is preferably washed from the substrate prior to adding further nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

- Then, a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is provided. These oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid, and the nucleic acid bound to the substrate is contacted with the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates with the nucleic acid. In this manner, the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates becomes bound to the substrate. After the nanoparticles are bound, any unbound nanoparticle-oligonucleotide conjugates and nucleic acid are washed from the substrate. A change (e.g., color change) may be discernible at this point.

- The oligonucleotides on the second type of nanoparticles may all have the same sequence or may have different sequences that hybridize with different portions of the nucleic acid to be detected. When oligonucleotides having different sequences are used, each nanoparticle may have all of the different oligonucleotides attached to it or, preferably, the different oligonucleotides may be attached to different nanoparticles. See Figure 17.

- Next, a binding oligonucleotide having a selected sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles, is contacted with the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates bound to the substrate under conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotide to the oligonucleotides on the nanoparticles. In this manner, the binding oligonucleotide

WU BARSIES

PCYJUSHIRI PW

becomes bound to the substrate. After the binding oligonucleotides are bound, unbound binding oligonucleotides are washed from the substrate.

Finally, a third type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto is provided. The oligonucleotides have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the binding oligonucleotide. The nanoparticle-oligonucleotide conjugates are contacted with the binding oligonucleotide bound to the substrate under conditions effective to allow hybridization of the binding oligonucleotide to the oligonucleotides on the nanoparticles. After the nanoparticles are bound, unbound nanoparticle-oligonucleotide conjugates are washed from the substrate.

The combination of hybridizations produces a detectable change. The detectable changes are the same as those described above, except that the multiple hybridizations result in an amplification of the detectable change. In particular, since each of the second type of nanoparticles has multiple oligonucleotides (having the same or different sequences) attached to it, each of the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates can hybridize to a plurality of the third type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates (through the binding oligonucleotide). Also, the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates may be hybridized to more than one portion of the nucleic acid to be detected. The amplification provided by the multiple hybridizations may make the change detectable for the first time or may increase the magnitude of the detectable change. The amplification increases the sensitivity of the assay, allowing for detection of small amounts of nucleic acid.

If desired, additional layers of nanoparticles can be built up by successive additions of the binding oligonucleotides and second and third types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. In this way, the nanoparticles immobilized per molecule of target nucleic acid can be further increased with a corresponding increase in intensity of the signal.

Also, the use of the binding oligonucleotide can be eliminated, and the second and third types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates can be designed so that they hybridize directly to each other.

Methods of making the nanoparticles and the oligonucleotides and of attaching the oligonucleotides to the nanoparticles are described above. The hybridization

WO 01/51655

PCT/US98/1330

conditions are well known in the art and can be readily optimized for the particular system employed (see above).

As an example of this method of detecting nucleic acid (analyte DNA) is illustrated in Figure 13B. As shown in that Figure, the combination of hybridizations produces dark areas where nanoparticle aggregates are linked to the substrate by analyte DNA. These dark areas may be readily observed with the naked eye as described above. As can be seen from Figure 13B, this embodiment of the method of the invention provides another means of amplifying the detectable signal.

Another amplification scheme employs liposomes. In this scheme, oligonucleotides are attached to a substrate. Suitable substrates are those described above, and the oligonucleotides can be attached to the substrates as described above. For instance, where the substrate is glass, this can be accomplished by condensing the oligonucleotides through phosphoryl or carboxylic acid groups to aminoalkyl groups on the substrate surface (for related chemistry see Grabar et al., *Anal. Chem.*, 67, 735-743 (1995)).

The oligonucleotides attached to the substrate have a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid to be detected. The nucleic acid is contacted with the substrate under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with the nucleic acid. In this manner the nucleic acid becomes bound to the substrate. Any unbound nucleic acid is preferably washed from the substrate before adding additional components of the system.

Next, the nucleic acid bound to the substrate is contacted with liposomes having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid, and the contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the liposomes with the nucleic acid. In this manner the liposomes become bound to the substrate. After the liposomes are bound to the substrate, the substrate is washed to remove any unbound liposomes and nucleic acid.

The oligonucleotides on the liposomes may all have the same sequence or may have different sequences that hybridize with different portions of the nucleic acid to be detected. When oligonucleotides having different sequences are used, each

WU 01/01/05

ECT/US/01/01/05

liposome may have all of the different oligonucleotides attached to it or the different oligonucleotides may be attached to different liposomes.

- To prepare oligonucleotide-liposome conjugates, the oligonucleotides are linked to a hydrophobic group, such as cholesterol (see Lettinger et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 115, 7535-7536 (1993)), and the hydrophobic-oligonucleotide conjugates are mixed with a solution of liposomes to form liposomes with hydrophobic-oligonucleotide conjugates anchored in the membrane (see Zhang et al., *Tetrahedron Lett.*, 37, 6243-6246 (1996)). The loading of hydrophobic-oligonucleotide conjugates on the surface of the liposomes can be controlled by controlling the ratio of hydrophobic-oligonucleotide conjugates to liposomes in the mixture. It has been observed that liposomes bearing oligonucleotides attached by hydrophobic interaction of pendant cholesterol groups are effective in targeting polymolecules immobilized on a nitrocellulose membrane (Id.). Fluorescein groups anchored in the membrane of the liposome were used as the reporter group. They served effectively, but sensitivity was limited by the fact that the signal from fluorescein in regions of high local concentration (e.g., on the liposome surface) is weakened by self quenching.

- The liposomes are made by methods well known in the art. See Zhang et al., *Tetrahedron Lett.*, 37, 6243 (1996). The liposomes will generally be about 5-50 times larger in size (diameter) than the nanoparticles used in subsequent steps. For instance, for nanoparticles about 15 nm in diameter, liposomes about 100 nm in diameter are preferably used.

- The liposomes bound to the substrate are contacted with a first type of nanoparticles having at least a first type of oligonucleotides attached thereto. The first type of oligonucleotides have a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles, and the contacting takes place under conditions effective to allow attachment of the oligonucleotides on the nanoparticles to the liposomes as a result of hydrophobic interactions. A detectable change may be observable at this point.

- The method may further comprise contacting the first type of nanoparticles-oligonucleotide conjugates bound to the liposomes with a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The first type of nanoparticles have a second type of oligonucleotides attached thereto which have a sequence

WO 01/51165

ECT/ASHUR/110

complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles, and the oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the second type of oligonucleotides on the first type of nanoparticles. The crosslinking takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the first and second types of nanoparticles. This hybridization will generally be performed at mild temperatures (e.g., 5°C to 60°C), so conditions (e.g., 6.3-1.0 M NaCl) conducive to hybridization at room temperature are employed. Following hybridization, unbound nanoparticle-oligonucleotide conjugates are washed from the substrate.

The combination of hybridizations produces a detectable change. The detectable changes are the same as those described above, except that the multiple hybridizations result in an amplification of the detectable change. In particular, since each of the liposomes has multiple oligonucleotides (having the same or different sequences) attached to it, each of the liposomes can hybridize to a plurality of the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. Similarly, since each of the first type of nanoparticles has multiple oligonucleotides attached to it, each of the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates can hybridize to a plurality of the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. Also, the liposomes may be hybridized to more than one portion of the nucleic acid to be detected. The amplification provided by this multiple hybridizations may make the change detectable for the first time or may increase the magnitude of the detectable change. This amplification increases the sensitivity of the assay, allowing for detection of small amounts of nucleic acid.

If desired, additional layers of nanoparticles can be built up by successive additions of the first and second types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. In this way, the number of nanoparticles immobilized per molecule of target nucleic acid can be further increased with a corresponding increase in the intensity of the signal.

Also, instead of using second and third types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates designed to hybridize to each other directly, nanoparticles bearing oligonucleotides that would serve to bring the nanoparticles together as a consequence of hybridization with binding oligonucleotides could be used.

WU 885/55

PC D88818191

Methods of making the nanoparticles and the oligonucleotides and of attaching the oligonucleotides to the nanoparticles are described above. A mixture of oligonucleotides functionalized at one end for binding to the nanoparticles and with or without a hydrophobic group at the other end can be used on the first type of nanoparticles. The relative ratio of these oligonucleotides bound to the average nanoparticle will be controlled by the ratio of the concentrations of the two oligonucleotides in the mixture. The hybridization conditions are well known in the art and can be readily optimized for the particular system employed (see above).

As an example of this method of detecting nucleic acid is illustrated in Figure 1B.

- 10 The hybridization of the first type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates to the liposomes may produce a detectable change. In the case of gold nanoparticles, a pink/red color may be observed or a purple/blue color may be observed if the nanoparticles are close enough together. The hybridization of the second type of nanoparticle-oligonucleotide conjugates to the first type of nanoparticle-
- 15 oligonucleotide conjugates will produce a detectable change. In the case of gold nanoparticles, a purple/blue color will be observed. All of these color changes may be observed with the naked eye.

In yet other embodiments utilizing a substrate, an "aggregate probe" can be used. The aggregate probe can be prepared by allowing two types of nanoparticles

- 20 having complementary oligonucleotides (a and a') attached to them to hybridize to form a core (illustrated in Figure 2BA). Since each type of nanoparticle has a plurality of oligonucleotides attached to it, each type of nanoparticles will hybridize to a plurality of the other type of nanoparticles. Thus, the core is an aggregate containing numerous nanoparticles of both types. The core is then capped with a third type of nanoparticles having at least two types of oligonucleotides attached to them. The first type of oligonucleotides has a sequence b which is complementary to the sequence b' of a portion of a nucleic acid to be detected. The second type of oligonucleotides has sequence a or a' so that the third type of nanoparticles will hybridize to nanoparticles on the exterior of the core. The aggregate probe can also be prepared by utilizing two
- 30 types of nanoparticles (see Figure 2BB). Each type of nanoparticles has at least two types of oligonucleotides attached to them. The first type of oligonucleotides present

WO 01/665

PCT/US98/110

on each of the two types of nanoparticles has sequence b which is complementary to the sequence b' of a portion of the nucleic acid to be detected. The second type of oligonucleotides on the first type of nanoparticles has a sequence a which is complementary to the sequence a' of the second type of oligonucleotides on the second type of nanoparticles (see Figure 28B) so that the two types of nanoparticles hybridize to each other to form the aggregate probe. Since each type of nanoparticles has a plurality of oligonucleotides attached to it, each type of nanoparticles will hybridize to a plurality of the other type of nanoparticles to form an aggregate containing numerous nanoparticles of both types.

- 10 The aggregate probe can be utilized to detect nucleic acid in any of the above assay formats performed on a substrate, eliminating the need to build up layers of individual nanoparticles in order to obtain or enhance a detectable change. To even further enhance the detectable change, layers of aggregate probes can be built up by using two types of aggregate probes, the first type of aggregate probe having
15 oligonucleotides attached to it that are complementary to oligonucleotides on the other type of aggregate probe. In particular, when the aggregate probe is prepared as illustrated in Figure 28B, the aggregate probes can hybridize to each other to form multiple layers. Some of the possible assay formats utilizing aggregate probes are illustrated in Figures 28C-D. For instance, a type of oligonucleotides comprising
20 sequence c is attached to a substrate (see Figure 28C). Sequence c is complementary to the sequence c' of a portion of a nucleic acid to be detected. The target nucleic acid is added and allowed to hybridize to the oligonucleotides attached to the substrate, after which the aggregate probe is added and allowed to hybridize to the portion of the target nucleic acid having sequence b', thereby producing a detectable
25 change. Alternatively, the target nucleic acid can first be hybridized to the aggregate probe in solution and subsequently hybridized to the oligonucleotides on the substrate, or the target nucleic acid can simultaneously be hybridized to the aggregate probe and the oligonucleotides on the substrate. In another embodiment, the target nucleic acid is allowed to react with the aggregate probe and another type of nanoparticles in solution (see Figure 28D). Some of the oligonucleotides attached to this additional
30 type of nanoparticles comprise sequence d so that they hybridize to sequence c' of the

WO 01/61665

PCT/US98/1196

target nucleic acid and some of the oligonucleotides attached to this additional type of nanoparticle comprise sequence d so that they can subsequently hybridize to oligonucleotides comprising sequence d' which are attached to the substrate.

The core itself can also be used as a probe to detect nucleic acids. One

- 5 possible assay format is illustrated in Figure 2DE. As illustrated there, a type of oligonucleotides comprising sequence b is attached to a substrate. Sequence b is complementary to the sequence b' of a portion of a nucleic acid to be detected. The target nucleic acid is contacted with the substrate and allowed to hybridize to the oligonucleotides attached to the substrate. Then, another type of nanoparticles is added. Some of the oligonucleotides attached to this additional type of nanoparticles
- 10 comprises sequence c so which is complementary to sequence c' of the target nucleic acid so that the nanoparticles hybridize to the target nucleic acid bound to the substrate. Some of the oligonucleotides attached to the additional type of nanoparticles comprise sequence a or a' complementary to sequences a and a' on the core probe, and the core probe is added and allowed to hybridize to the
- 15 oligonucleotides on the nanoparticles. Since each core probe has sequences a and a' attached to the nanoparticles which comprise the core, the core probes can hybridize to each other to form multiple layers attached to the substrate, providing a greatly enhanced detectable change. In alternative embodiments, the target nucleic acid
- 20 could be contacted with the additional type of nanoparticles in solution prior to being contacted with the substrate, or the target nucleic acid, the nanoparticles and the substrate could all be contacted simultaneously. In yet another alternative embodiment, the additional type of nanoparticles could be replaced by a linking oligonucleotide comprising both sequences c and a'.

- 25 When a substrate is employed, a plurality of the initial types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates or oligonucleotides can be attached to the substrate in an array for detecting multiple portions of a target nucleic acid, for detecting multiple different nucleic acids, or both. For instance, a substrate may be provided with rows of spots, each spot containing a different type of oligonucleotide or oligonucleotide-nanoparticle conjugate designed to bind to a portion of a target nucleic acid. A
- 30 sample containing one or more nucleic acids is applied to each spot, and the rest of

WO 01/5165

PC/T/US/01/190

the assay is performed in one of the ways described above using appropriate oligonucleotide-nanoparticle conjugates, oligonucleotide-liposome conjugates, aggregate probes, core probes, and binding oligonucleotides.

- Finally, when a substrate is employed, a detectable change can be produced or
 5 further enhanced by silver staining. Silver staining can be employed with any type of nanoparticles that catalyze the reduction of silver. Preferred are nanoparticles made of noble metals (e.g., gold and silver). See Bassell, et al., *J. Cell Biol.*, 126, 863-876 (1994); Braun-Huward et al., *Biotechnology*, 13, 928-931 (1992). If the nanoparticles being employed for the detection of a nucleic acid do not catalyze the
 10 reduction of silver, then silver ions can be complexed to the nucleic acid to catalyze the reduction. See Braun et al., *Nature*, 391, 775 (1998). Also, silver stains are known which can react with the phosphate groups on nucleic acids.

- Silver staining can be used to produce or enhance a detectable change in any assay performed on a substrate, including those described above. In particular, silver staining has been found to provide a huge increase in sensitivity for assays employing
 15 a single type of nanoparticles, such as the one illustrated in Figure 25A, so that the use of layers of nanoparticles, aggregate probes and core probes can often be eliminated.

- In assays for detecting nucleic acids performed on a substrate, the detectable change can be observed with an optical sensor. Suitable sensors include those used to scan documents into a computer which are capable of operating in the reflective mode (e.g., a flatbed scanner), other devices capable of performing this function or which utilize the same type of optics, any type of grayscale-sensitive measurement device, and standard scanners which have been modified to scan substrates according to the invention (e.g., a flatbed scanner modified to include a holder for the substrate)
 25 (to date, it has not been found possible to use scanners operating in the transmissive mode). The resolution of the scanner must be sufficient so that the reaction area on the substrate is larger than a single pixel of the scanner. The scanner can be used with any substrate, provided that the detectable change produced by the assay can be observed against the substrate (e.g., a grey spot, such as that produced by silver
 30 staining, can be observed against a white background, but cannot be observed against a grey background). The scanner can be a black-and-white scanner or, preferably, a

WU 615/165

PCT/US98/01594

- color scanner. Most preferably, the scanner is a standard color scanner of the type used to scan documents into computers. Such scanners are inexpensive and readily available commercially. For instance, an Epson Expression G36 (600 x 600 dpi), a UMAX Astra 1200 (300 x 300 dpi), or a Microtek 1600 (1600 x 1600 dpi) can be used. The scanner is linked to a computer loaded with software for processing the images obtained by scanning the substrate. The software can be standard software which is readily available commercially, such as Adobe Photoshop 5.2 and Corel Photopaint 8.0. Using the software to calculate grayscale measurements provides a means of quantitating the results of the assays. The software can also provide a color number for colored spots and can generate images (e.g., printouts) of the scans which can be reviewed to provide a qualitative determination of the presence of a nucleic acid, the quantity of a nucleic acid, or both. In addition, it has been found that the sensitivity of assays such as that described in Example 5 can be increased by subtracting the color that represents a negative result (red in Example 5) from the color that represents a positive result (blue in Example 5). The computer can be a standard personal computer which is readily available commercially. Thus, the use of a standard scanner linked to a standard computer loaded with standard software can provide a convenient, easy, inexpensive means of detecting and quantitating nucleic acids when the assays are performed on substrates. The scans can also be stored in the computer to maintain a record of the results for further reference or use. Of course, more sophisticated instruments and software can be used, if desired.
- A nanoparticle-oligonucleotide conjugate which may be used in an assay for any nucleic acid is illustrated in Figure 17D-E. This "universal probe" has oligonucleotides of a single sequence attached to it. These oligonucleotides can hybridize with a binding oligonucleotide which has a sequence comprising at least two portions. The first portion is complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles. The second portion is complementary to a portion of the sequence of the nucleic acid to be detected. A plurality of binding oligonucleotides having the same first portion and different second portions can be used, in which case the "universal probe", after hybridization to the binding

WO 00/3165

PC1000000000

oligonucleotides, can bind to multiple portions of the nucleic acid to be detected or to different nucleic acid targets.

In a number of other embodiments of the invention, the detectable change is created by labeling the oligonucleotides, the nanoparticles, or both with molecules (e.g., fluorescent molecules and dyes) that produce detectable changes upon hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the target nucleic acid. For instance, oligonucleotides attached to metal and semiconductor nanoparticles can have a fluorescent molecule attached to the end not attached to the nanoparticles.

Metal and semiconductor nanoparticles are known fluorescence quenchers, with the magnitude of the quenching effect depending on the distance between the nanoparticles and the fluorescent molecule. In the unhybridized state, the oligonucleotides attached to the nanoparticles interact with the nanoparticles, so that significant quenching will be observed. See Figure 20A. Upon hybridization to a target nucleic acid, the fluorescent molecule will become spaced away from the nanoparticles, diminishing quenching of the fluorescence. See Figure 20B. Longer oligonucleotides should give rise to larger changes in fluorescence, at least until the fluorescent groups are moved far enough away from the nanoparticle surfaces so that an increase in the change is no longer observed. Useful lengths of the oligonucleotides can be determined empirically. Metallic and semiconductor nanoparticles having fluorescent-labeled oligonucleotides attached thereto can be used in any of the assay formats described above, including those performed in solution or on substrates.

Methods of labeling oligonucleotides with fluorescent molecules and measuring fluorescence are well known in the art. Suitable fluorescent molecules are also well known in the art and include the fluoresceins, rhodamines and Texas Red. The oligonucleotides will be attached to the nanoparticles as described above.

In yet another embodiment, two types of fluorescent-labeled oligonucleotides attached to two different particles can be used. Suitable particles include polymeric particles (such as polystyrene particles, polystyrene particles, acrylate and methacrylate particles), glass particles, latex particles, Sepharose beads and others like particles well known in the art. Methods of attaching oligonucleotides to such particles are well known in the art. See Chissey et al., *Nucleic Acid Research*, 24, 3031-3039

WU 615165

PCT/US98/179

- (1996) (glass) and Choumry et al., *Langmuir*, 13, 3103-3110 (1997), Paby et al., *Nucleic Acids Research*, 21, 1819-1826 (1993), Elaissari et al., *J. Colloid Interface Sci.*, 202, 251-260 (1998), Kabanov et al., *Macromolecules*, 20, 196-198 (1998) and Wolf et al., *Nucleic Acids Research*, 15, 2911-2926 (1987) (polymers). In particular, a wide variety of functional groups are available on the particles or can be incorporated into such particles. Functional groups include carboxylic acids, aldehydes, amino groups, cyano groups, ethylene groups, hydrazyl groups, mercapto groups, and the like. Nanoparticles, including metallic and semiconductor nanoparticles, can also be used.
- 10 The two fluorophores are designated d and a for donor and acceptor. A variety of fluorescent molecules useful in such combinations are well known in the art and are available from, e.g., Molecular Probes. An attractive combination is fluorescein as the donor and Texas Red as acceptor. The two types of oligonucleotide-coagulates with d and a attached are mixed with the target nucleic acid, and fluorescence measured in a fluorimeter. The mixture will be excited with light of the wavelength that excites d, and the mixture will be monitored for fluorescence from a. Upon hybridization, d and a will be brought in proximity (see Figure 20B). In the case of non-metallic, non-semiconductor particles, hybridization will be shown by a shift in fluorescence from that for d to that for a or by the appearance of fluorescence for a in addition to that for d. In the absence of hybridization, the fluorophores will be too far apart for energy transfer to be significant, and only the fluorescence of d will be observed. In the case of metallic and semiconductor nanoparticles, lack of hybridization will be shown by a lack of fluorescence due to d or a because of quenching (see above). Hybridization will be shown by an increase in fluorescence due to a.
- 25 As will be appreciated, the above described particles and nanoparticles having oligonucleotides labeled with acceptor and donor fluorescent molecules attached can be used in the assay formats described above, including those performed in solution and on substrates. For solution formats, the oligonucleotide sequences are preferably chosen so that they bind to the target nucleic acid as illustrated in Figures 15A-G. In the formats shown in Figure 13A-B and 16, the binding oligonucleotides may be used

WO 03/01445

PC75086(W) 198

to bring the acceptor and donor fluorescent molecules on the two nanoparticles in proximity. Also, in the format illustrated in Figure 13A, the oligonucleotides attached to the substrate may be labeled with d. Further, other labels besides fluorescent molecules can be used, such as chemiluminescent molecules, which will give a discernable signal or a change in detectable signal upon hybridization.

- Another embodiment of the detection method of the invention is a very sensitive system that utilizes detection of changes in fluorescence and color (illustrated in Figure 21). This system employs latex microspheres to which are attached oligonucleotides labeled with a fluorescent molecule and gold nanoparticles to which are attached oligonucleotides. The oligonucleotide-nanoparticle conjugates can be prepared as described above. Methods of attaching oligonucleotides to latex microspheres are well known (see, e.g., Cattey et al., *Langmuir*, 13:3189-3190 (1997); Elaissari et al., *J. Colloid Interface Sci.*, 202:251-260 (1998)), as are methods of labeling oligonucleotides with fluorescent molecules (see above). The oligonucleotides on the latex microspheres and the oligonucleotides on the gold nanoparticles have sequences capable of hybridizing with different portions of the sequence of a target nucleic acid, but not with each other. When a target nucleic acid comprising sequences complementary to the sequences of the oligonucleotides on the latex microspheres and gold nanoparticles is contacted with the two probes, a network structure is formed (see Figure 21). Due to the quenching properties of the gold nanoparticles, the fluorescence of the oligonucleotides attached to the latex microspheres is quenched while part of this network. Indeed, one gold nanoparticle can quench many fluorophore molecules since gold nanoparticles have very large absorption coefficients. Thus, the fluorescence of a solution containing nucleic acid and the two particles can be monitored to detect the results, with a reduction in, or elimination of, fluorescence indicating a positive result. Preferably, however, the results of the assay are detected by placing a droplet of the solution onto a microporous material (see Figure 21). The microporous material should be transparent or a color (e.g., white) which allows for detection of the platted color of the gold nanoparticles. The microporous material should also have a pore size sufficiently large to allow the gold nanoparticles to pass through the pores and

WO 01/01665

EC/EU/EP/JP/US

sufficiently small to retain the latex microspheres on the surface of the microporous material when the microporous material is washed. Thus, when using such a microporous material, the size (diameter) of the latex microspheres must be larger than the size (diameter) of the gold nanoparticles. The microporous material must also be inert to biological media. Many suitable microporous materials are known in the art and include various filters and membranes, such as modified polyvinylidene fluoride (PVDF, such as DuraporeTM membrane filters purchased from Millipore Corp.) and pure cellulose acetate (such as AcetatePlusTM membrane filters purchased from Microm Separations Inc.). Such a microporous material retains the network composed of target nucleic acid and the two probes, and a positive result (presence of the target nucleic acid) is evidenced by a red/pink color (due to the presence of the gold nanoparticles) and a lack of fluorescence (due to quenching of fluorescence by the gold nanoparticles) (see Figure 21). A negative result (no target nucleic acid present) is evidenced by a white color and fluorescence, because the gold nanoparticles would pass through the pores of the microporous material when it is washed (so no quenching of the fluorescence would occur), and the white latex microspheres would be trapped on top of it (see Figure 21). In addition, in the case of a positive result, changes in fluorescence and color can be observed as a function of temperature. For instance, as the temperature is raised, fluorescence will be observed once the denaturation temperature has been reached. Therefore, by looking at color or fluorescence as a function of temperature, information can be obtained about the degree of complementarity between the oligonucleotide probes and the target nucleic acid. As noted above, this detection method exhibits high sensitivity. As little as 5 femtomoles of single-stranded target nucleic acid 24 bases in length and 20 femtomoles of double-stranded target nucleic acid 24 bases in length have been detected with the naked eye. The method is also very simple to use. Fluorescence can be generated by simply illuminating the solution or microporous material with a UV lamp, and the fluorometer and colorimetric signals can be monitored by the naked eye. Alternatively, for a more quantitative result, a fluorimeter can be employed in front-face mode to measure the fluorescence of the solution with a short pathlength.

WU 410365

PCT/US01/0190

The above embodiment has been described with particular reference to latex microspheres and gold nanoparticles. Any other microsphere or nanoparticle, having the other properties described above and to which oligonucleotides can be attached, can be used in place of these particles. Many suitable particles and nanoparticles are described above, along with techniques for attaching oligonucleotides to them. In addition, microspheres and nanoparticles having other measurable properties may be used. For instance, polymer-modified particles and nanoparticles, whose the polymer can be modified to have any desirable property, such as fluorescence, color, or electrochemical activity, can be used. See, Winton et al., *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 462-463 (1999) (polymer-modified gold nanoparticles). Also, magnetic, polymer-coated magnetic, and semiconducting particles can be used. See Chan et al., *Science*, **281**, 2016 (1998); Bruchez et al., *Science*, **281**, 2013 (1998); Kolarova et al., *Biotechnology*, **20**, 196-198 (1996).

In yet another embodiment, two probes comprising metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides labeled with fluorescent molecules attached to them are employed (illustrated in Figure 22). The oligonucleotide-nanoparticle conjugates can be prepared and labeled with fluorescent molecules as described above. The oligonucleotides on the two types of oligonucleotide nanoparticle conjugates have sequences capable of hybridizing with different portions of the sequence of a target nucleic acid, but not with each other. When a target nucleic acid comprising sequences complementary to the sequences of the oligonucleotides on the nanoparticles is contacted with the two probes, a network structure is formed (see Figure 22). Due to the quenching properties of the metallic or semiconductor nanoparticle, the fluorescence of the oligonucleotides attached to the nanoparticles is quenched while part of this network. Thus, the fluorescence of a solution containing nucleic acid and the two probes can be monitored to detect the results, with a reduction in, or elimination of, fluorescence indicating a positive result. Preferably, however, the results of the assay are detected by placing a droplet of the solution onto a microporous material (see Figure 22). The microporous material should have a pore size sufficiently large to allow the nanoparticles to pass through the pores and sufficiently small to retain the network on the surface of the microporous material

WO 01/51665

PCT/US98/1316

- when the microporous material is washed (see Figure 22). Many suitable microporous materials are known in the art and include those described above. Such a microporous material retains the networks composed of target nucleic acid and the two probes, and a positive result (presence of the target nucleic acid) is evidenced by a lack of fluorescence (due to quenching of fluorescence by the matrix or semiconductor nanoparticles) (see Figure 22). A negative result (no target nucleic acid present) is evidenced by fluorescence because the nanoparticles would pass through the pores of the microporous material when it is washed (so no quenching of the fluorescence would occur) (see Figure 22). There is low background fluorescence because unbound probes are washed away from the detection area. In addition, in the case of a positive result, changes in fluorescence can be observed as a function of temperature. For instance, as the temperature is raised, fluorescence will be observed once the denaturation temperature has been reached. Therefore, by looking at fluorescence as a function of temperature, information can be obtained about the degree of complementarity between the oligonucleotide probes and the target nucleic acid. Fluorescence can be generated by simply illuminating the solution or microporous material with a UV lamp, and the fluorescent signal can be monitored by the naked eye. Alternatively, for a more quantitative result, a fluorometer can be employed in front-face mode to measure the fluorescence of the solution with a short path length.

- In yet other embodiments, a "satellite probe" is used (see Figure 24). The satellite probe comprises a central particle with one or several physical properties that can be exploited for detection in an assay for nucleic acids (e.g., intense color, fluorescence quenching ability, magnetism). Suitable particles include the nanoparticles and other particles described above. The particle has oligonucleotides (all having the same sequence) attached to it (see Figure 24). Methods of attaching oligonucleotides to the particles are described above. These oligonucleotides comprise at least a first portion and a second portion, both of which are complementary to portions of the sequence of a target nucleic acid (see Figure 24). The satellite probe also comprises probe oligonucleotides. Each probe oligonucleotide has at least a first portion and a second portion (see Figure 24). The

WO 01/01165

PC/T/SH00/110

sequence of the first portion of the probe oligonucleotides is complementary to the first portion of the sequence of the oligonucleotides immobilized on the central particle (see Figure 24). Consequently, when the central particle and the probe oligonucleotides are brought into contact, the oligonucleotides on the particle hybridize with the probe oligonucleotides to form the satellite probe (see Figure 24). Both the first and second portions of the probe oligonucleotides are complementary to portions of the sequence of the target nucleic acid (see Figure 24). Each probe oligonucleotide is labeled with a reporter molecule (see Figure 24), as further described below. The amount of hybridization overlap between the probe oligonucleotides and the target (length of the portion hybridized) is as large as, or greater than, the hybridization overlap between the probe oligonucleotides and the oligonucleotides attached to the particle (see Figure 24). Therefore, temperature cycling resulting in dehybridization and rehybridization would favor moving the probe oligonucleotides from the central particle to the target. Then, the particles are separated from the probe oligonucleotides hybridized to the target, and the reporter molecule is detected.

The satellite probe can be used in a variety of detection strategies. For example, if the central particle has a magnetic core and is covered with a material capable of quenching the fluorescence of fluorophores attached to the probe oligonucleotides that surround it, this system can be used in an *in situ* fluorescent detection scheme for nucleic acids. Functionalized polymer-coated magnetic particles (Fe_3O_4) are available from several commercial sources including Dymal (DynabeadTM) and Bangs Laboratories (BitasporTM), and silica-coated magnetic Fe_3O_4 nanoparticles could be modified (Liu et al., *Chem. Mater.*, 10, 3936-3940 (1998)) using well-developed silica surface chemistry (Chisley et al., *Nucleic Acids Research*, 24, 3031-3039 (1996)) and employed as magnetic probes as well. Further, the dye molecule, 4-(4-(dimethylamino)phenyl)-azo-benzoic acid (DABCYL) has been shown to be an efficient quencher of fluorescence for a wide variety of fluorophores attached to oligonucleotides (Tyagi et al., *Nature Biotech.*, 16, 49-53 (1998)). The commercially-available nucleosidyl ester of DABCYL (Molecular Probes) forms extremely stable imide bonds upon reaction with primary alkymino

WU 018565

PCT/US01/110

groups. Thus, any magnetic particle or polymer-coated magnetic particle with primary alkyl amino groups could be modified with both oligonucleotides, as well as these quencher molecules. Alternatively, the DABCYL quencher could be attached directly to the surface-bound oligonucleotide, instead of the alkyl amino-modified surface. The satellite probe comprising the probe oligonucleotide is brought into contact with the target. The temperature is cycled so as to cause dehybridization and rehybridization, which causes the probe oligonucleotides to move from the central particle to the target. Detection is accomplished by applying a magnetic field and removing the particles from solution and measuring the fluorescence of the probe oligonucleotides remaining in solution hybridized to the target.

This approach can be extended to a colorimetric assay by using magnetic particles with a dye coating in conjunction with probe oligonucleotides labeled with a dye which has optical properties that are distinct from the dye on the magnetic nanoparticles or perturb those of the dye on the magnetic nanoparticles. When the particles and the probe oligonucleotides are in solution together, the solution will exhibit one color which derives from a combination of the two dyes. However, in the presence of a target nucleic acid and with temperature cycling, the probe oligonucleotides will move from the satellite probe to the target. Once this has happened, application of a magnetic field will remove the magnetic, dye-coated particles from solution leaving behind probe oligonucleotides labeled with a single dye hybridized to the target. The system can be followed with a colorimeter or the naked eye, depending upon target levels and color intensities.

This approach also can be further extended to an electrochemical assay by using an oligonucleotide-magnetic particle conjugate in conjunction with a probe oligonucleotide having attached a redox-active molecule. Any modifiable redox-active species can be used, such as the well-studied redox-active ferrocene derivative. A ferrocene derivatized phosphoramidite can be attached to oligonucleotides directly using standard phosphoramidite chemistry. Mucio et al., *Chem. Commun.*, 555 (1996); Eickstein, et., in *Oligonucleotides and Analogues*, 1st ed., Oxford University, New York, NY (1991). The ferrocenylphosphoramidite is prepared in a two-step synthesis from 6-bromohexylferrocene. In a typical preparation, 6-

WU 01/01/05

PCT/US2003/01000

bromohexylferrocene is stirred in an aqueous HMPA solution at 120°C for 6 hours to form 6-hydroxyhexylferrocene. After purification, the 6-hydroxyhexylferrocene is added to a THF solution of *N,N*-diisopropylethylamine and beta-cyanoethyl-*N,N*-diisopropylphosphoramidite to form the ferrocenylphosphoramidite.

- 5 Oligonucleotide-modified polymer-coated gold nanoparticles, where the polymer contains electrochemically-active ferrocene moieties, could also be utilized. Watson et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 121, 462-463 (1999). A copolymer of amino reactive sites (e.g., anhydride) could be incorporated into the polymer for reaction with amino-modified oligonucleotides. Moller et al., *Bioconjugate Chem.*, 6, 174-178 (1995). In the presence of target and with temperature cycling, the redox-active probe oligonucleotides will move from the satellite probe to the target. Once this has happened, application of the magnetic field will remove the magnetic particles from solution leaving behind the redox-active probe oligonucleotides hybridized with the target nucleic acid. The amount of target then can be determined by cyclic voltammetry or any electrochemical technique that can interrogate the redox-active molecule.

- 15 In yet another embodiment of the invention, a nucleic acid is detected by contacting the nucleic acid with a substrate having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid. The oligonucleotides are located between a pair of electrodes located on the substrate. The substrate must be made of a material which is not a conductor of electricity (e.g., glass, quartz, polymers, plastics). The electrodes may be made of any standard material (e.g., metals, such as gold, platinum, tin oxide). The electrodes can be fabricated by conventional microfabrication techniques. See, e.g., *Introduction To Microfabrication* (L.P. Thompson et al., eds., American Chemical Society, Washington, D.C. 1983). The substrate may have a plurality of pairs of electrodes located on it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both. Arrays of electrodes can be purchased (e.g., from AbbotSciencific, Inc., Richmond, Virginia) or can be made by conventional microfabrication techniques. See, e.g., *Introduction To Microfabrication* (L.P. Thompson et al., eds.,
- 20
- 25
- 30

WO 01/01145

PCT/US99/01145

- American Chemical Society, Washington, D.C. 1993). Suitable photomasks for making the arrays can be purchased (e.g., from Photronics, Milpitas, CA). Each of the pairs of electrodes in the array will have a type of oligonucleotides attached to the substrate between the two electrodes. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the substrate with the nucleic acid. Then, the nucleic acid bound to the substrate, is contacted with a type of nanoparticles. The nanoparticles must be made of a material which can conduct electricity. Such nanoparticles include those made of metal, such as gold nanoparticles, and semiconductor materials. The nanoparticles will have one or more types of oligonucleotides attached to them, at least one of the types of oligonucleotides having a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid. The contacting takes place under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles with the nucleic acid. If the nucleic acid is present, the circuit between the electrodes should be closed because of the attachment of the nanoparticles to the substrate between the electrodes, and a change in conductivity will be detected. If the binding of a single type of nanoparticles does not result in closure of the circuit, this situation can be remedied by using a closer spacing between the electrodes, using larger nanoparticles, or employing another material that will close the circuit (but only if the nanoparticles have been bound to the substrate between the electrodes). For instance, when gold nanoparticles are used, the substrate can be contacted with silver stain (as described above) to deposit silver between the electrodes to close the circuit and produce the detectable change in conductivity. Another way to close the circuit in the case where the addition of a single type of nanoparticles is not sufficient, is to contact the first type of nanoparticles bound to the substrate with a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached to them that have a sequence complementary to the oligonucleotides on the first type of nanoparticles. The contacting will take place under conditions effective so that the oligonucleotides on the second type of nanoparticles hybridize to those on the first type of oligonucleotides. If needed, or, desired, additional layers of nanoparticles can be built up by alternately adding the first and second types of nanoparticles until a sufficient number of nanoparticles are

WU 0161555

PCT/US2001/014

attached to the substrate to close the circuit. Another alternative to building up individual layers of nanoparticles would be the use of an aggregate probe (see above).

The invention also provides kits for detecting nucleic acids. In one embodiment, the kit comprises at least one container, the container holding at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides on the first type of nanoparticles have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The container may further comprise filler

oligonucleotides having a sequence complementary to a third portion of the nucleic acid, the third portion being located between the first and second portions. The filler oligonucleotide may also be provided in a separate container.

In a second embodiment, the kit comprises at least two containers. The first container holds nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The second container holds nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The kit may further comprise a third container holding a filler oligonucleotide having a sequence complementary to a third portion of the nucleic acid, the third portion being located between the first and second portions.

In another alternative embodiment, the kits can have the oligonucleotides and nanoparticles in separate containers, and the oligonucleotides would have to be attached to the nanoparticles prior to performing an assay to detect a nucleic acid. The oligonucleotides and/or the nanoparticles may be functionalized so that the oligonucleotides can be attached to the nanoparticles. Alternatively, the oligonucleotides and/or nanoparticles may be provided in the kit without functional groups, in which case they must be functionalized prior to performing the assay.

In another embodiment, the kit comprises at least one container. The container holds metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a portion

WO 01/01465

PCT/US98/1799

of a nucleic acid and have fluorescent molecules attached to the ends of the oligonucleotides not attached to the nanoparticles.

In yet another embodiment, the kit comprises a substrate, the substrate having attached thereto nanoparticles. The nanoparticles have oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also includes a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The oligonucleotides may have the same or different sequences, but each of the oligonucleotides has a sequence complementary to a portion of the nucleic acid. The kit further includes a second container holding a binding oligonucleotide having a riboswitch sequence having at least two portions, the first portion being complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles in the first container. The kit also includes a third container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to the sequence of a second portion of the binding oligonucleotide.

In another embodiment, the kit comprises a substrate having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also includes a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The oligonucleotides may have the same or different sequences, but each of the oligonucleotides has a sequence complementary to a portion of the nucleic acid. The kit further includes a second container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to at least a portion of the oligonucleotides attached to the nanoparticles in the first container.

In yet another embodiment, the kits can have the substrate, oligonucleotides and nanoparticles in separate containers. The substrate, oligonucleotides, and nanoparticles would have to be appropriately attached to each other prior to performing an assay to detect a nucleic acid. The substrate, oligonucleotides and/or the nanoparticles may be functionalized to expedite this attachment. Alternatively,

WO 03/01465

PC/D200401/190

the substrate, oligonucleotides and/or nanoparticles may be provided in the kit without functional groups, in which case they must be functionalized prior to performing the assay.

- In a further embodiment, the kit comprises a substrate having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also includes a first container holding liposomes having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid and a second container holding nanoparticles having at least a first type of oligonucleotides attached thereto, the first type of oligonucleotides having a cholesterol group attached to the end not attached to the nanoparticles so that the nanoparticles can attach to the liposomes by hydrophobic interaction. The kit may further comprise a third container holding a second type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto, the oligonucleotides having a sequence complementary to at least a portion of the sequence of a second type of oligonucleotides attached to the first type of nanoparticles. The second type of oligonucleotides attached to the first type of nanoparticles having a sequence complementary to the sequence of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles.

- In another embodiment, the kit may comprise a substrate having nanoparticles attached to it. The nanoparticles have oligonucleotides attached to them which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also includes a first container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

- In yet another embodiment, the kit may comprise a substrate having oligonucleotides attached to it. The oligonucleotides have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit further includes a first

WO 01/51555

PCT/US99/1199

container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

In an additional embodiment, the kit may comprise a substrate having oligonucleotides attached to it and a first container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a sequence complementary to a first portion of the sequence of the nucleic acid. The kit also includes a second container holding nanoparticles.

The nanoparticles have at least two types of oligonucleotides attached to them. The first type of oligonucleotides has a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid. The second type of oligonucleotides has a sequence complementary to at least a portion of the sequence of the oligonucleotides attached to the substrate.

In another embodiment, the kit may comprise a substrate which has oligonucleotides attached to it. The oligonucleotides have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The kit also comprises a first container holding liposomes having oligonucleotides attached to them. The oligonucleotides have a sequence complementary to the sequence of a second portion of the nucleic acid. The kit further includes a second container holding an aggregate probe comprising at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a hydrophobic groups attached to the ends not attached to the nanoparticles.

WU 81/8165

ECT/DSB/1750

- In a further embodiment, the kit may comprise a first container holding nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. The kit also includes one or more additional containers, each container holding a binding oligonucleotide. Each binding oligonucleotide has a first portion which has a sequence complementary to at least a portion of the sequence of oligonucleotides on the nanoparticles and a second portion which has a sequence complementary to the sequence of a portion of a nucleic acid to be detected. The sequences of the second portions of the binding oligonucleotides may be different as long as each sequence is complementary to a portion of the sequence of the nucleic acid to be detected. In another embodiment, the kit comprises a container holding one type of nanoparticles having oligonucleotides attached thereto and one or more types of binding oligonucleotides. Each of the types of binding oligonucleotides has a sequence comprising at least two portions. The first portion is complementary to the sequence of the oligonucleotides on the nanoparticles, whereby the binding oligonucleotides are hybridized to the oligonucleotides on the nanoparticles in the container(s). The second portion is complementary to the sequence of a portion of the nucleic acid.
- In another embodiment, kits may comprise one or two containers holding two types of particles. The first type of particles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a first portion of a nucleic acid. The oligonucleotides are labeled with an energy donor on the ends not attached to the particles. The second type of particles having oligonucleotides attached thereto which have a sequence complementary to the sequence of a second portion of a nucleic acid. The oligonucleotides are labeled with an energy acceptor on the ends not attached to the particles. The energy donors and acceptors may be fluorescent molecules.
- In a further embodiment, the kit comprises a first container holding a type of latex microspheres having oligonucleotides attached thereto. The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid and are labeled with a fluorescent molecule. The kit also comprises a second container holding a type of gold nanoparticles having oligonucleotides attached

WU 01/05/04

PC/DEN/01/05/04

thereto. These oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of the nucleic acid.

In another embodiment, the kit comprises a first container holding a first type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto.

- 5 The oligonucleotides have a sequence complementary to a first portion of the sequence of a nucleic acid and are labeled with a fluorescent molecule. The kit also comprises a second container holding a second type of metallic or semiconductor nanoparticles having oligonucleotides attached thereto. These oligonucleotides have a sequence complementary to a second portion of the sequence of a nucleic acid and are labeled with a fluorescent molecule.

- 10 In a further embodiment, the kit comprises a container holding a satellite probe. The satellite probe comprises a particle having attached thereto oligonucleotides. The oligonucleotides have a first portion and a second portion, both portions having sequences complementary to portions of the sequence of a nucleic acid. The satellite probe also comprises probe oligonucleotides hybridized to the oligonucleotides attached to the nanoparticles. The probe oligonucleotides have a first portion and a second portion. The first portion has a sequence complementary to the sequence of the first portion of the oligonucleotides attached to the particles, and both portions have sequences complementary to portions of the sequence of the nucleic acid. The probe oligonucleotides also have a reporter molecule attached to one end.

- 20 In another embodiment, the kit may comprise a container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a sequence complementary to a portion of the sequence of a nucleic acid.

- 30 In an additional embodiment, the kit may comprise a container holding an aggregate probe. The aggregate probe comprises at least two types of nanoparticles having oligonucleotides attached to them. The nanoparticles of the aggregate probe

WU 818/105

PC DUSHU194

are bound to each other as a result of the hybridization of some of the oligonucleotides attached to each of them. At least one of the types of nanoparticles of the aggregate probe has oligonucleotides attached to it which have a hydrophobic group attached to the end not attached to the nanoparticles.

- 5 In yet another embodiment, the invention provides a kit comprising a substrate having located thereon at least one pair of electrodes with oligonucleotides attached to the substrate between the electrodes. In a preferred embodiment, the substrate has a plurality of pairs of electrodes attached to it in an array to allow for the detection of multiple portions of a single nucleic acid, the detection of multiple different nucleic acids, or both.

- 10 The kits may also contain other reagents and items useful for detecting nucleic acid. The reagents may include PCR reagents, reagents for silver staining, hybridization reagents, buffers, etc. Other items which may be provided as part of the kit include a solid surface (for visualizing hybridization) such as a TLC silica plate, microporous materials, syringes, pipettes, cuvettes, containers, and a thermocycler (for controlling hybridization and de-hybridization temperatures). Reagents for functionalizing the nucleotides or nanoparticles may also be included in the kit.

- 15 The precipitation of aggregated nanoparticles provides a means of separating a selected nucleic acid from other nucleic acids. This separation may be used as a step in the purification of the nucleic acid. Hybridization conditions are those described above for detecting a nucleic acid. If the temperature is below the T_m (the temperature at which one-half of an oligonucleotide is bound to its complementary strand) for the binding of the oligonucleotides on the nanoparticles to the nucleic acid, then sufficient time is needed for the aggregate to settle. The temperature of hybridization (e.g., as measured by T_m) varies with the type of salt (NaCl or MgCl₂) and its concentration. Salt compositions and concentrations are selected to promote hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to the nucleic acid at convenient working temperatures without inducing aggregation of the colloids in the absence of the nucleic acid.

- 20 30 The invention also provides a method of nanofabrication. The method comprises providing at least one type of linking oligonucleotide having a selected

WO 02/01105

PCT/JP00/01105

sequence. A linking oligonucleotide used for nanofabrication may have any desired sequence and may be single-stranded or double stranded. It may also contain chemical modifications in the base, sugar, or backbone sections. The sequences chosen for the linking oligonucleotides and their lengths and strandness will contribute to the rigidity or flexibility of the resulting nanomaterial or nanostructure. The use of a single type of linking oligonucleotide, as well as mixtures of two or more different types of linking oligonucleotides, is contemplated. The number of different linking oligonucleotides used and their lengths will contribute to the shape, pore size and other structural features of the resulting nanomaterials and nanostructures.

The sequence of a linking oligonucleotide will have at least a first portion and a second portion for binding to oligonucleotides on nanoparticles. The first, second or more binding portions of the linking oligonucleotide may have the same or different sequences.

If all of the binding portions of a linking oligonucleotide have the same sequence, only a single type of nanoparticle with oligonucleotides having a complementary sequence attached thereto need be used to form a nanomaterial or nanostructure. If the two or more binding portions of a linking oligonucleotide have different sequences, then two or more nanoparticle-oligonucleotide conjugates must be used. See, e.g., Figure 17. The oligonucleotides on each of the nanoparticles will have a sequence complementary to one of the two or more binding portions of the sequence of the linking oligonucleotide. The number, sequence(s) and length(s) of the binding portions and the distance(s), if any, between them will contribute to the structural and physical properties of the resulting nanomaterials and nanostructures. Of course, if the linking oligonucleotide comprises two or more portions, the sequences of the binding portions must be chosen so that they are not complementary to each other to avoid having one portion of the linking nucleotide bind to another portion.

The linking oligonucleotides and nanoparticle-oligonucleotide conjugates are contacted under conditions effective for hybridization of the oligonucleotides attached to the nanoparticles with the linking oligonucleotides so that a desired nanomaterial or

WO 01/01665

FIG. 10

nanosurface is formed wherein the nanoparticles are held together by oligonucleotide connectors. These hybridization conditions are well known in the art and can be optimized for a particular nanofabrication scheme (see above). Stringent hybridization conditions are preferred.

- 5 The invention also provides another method of nanofabrication. This method comprises providing at least two types of nanoparticle-oligonucleotide conjugates. The oligonucleotides on the first type of nanoparticles have a sequence complementary to that of the oligonucleotides on the second type of nanoparticles. The oligonucleotides on the second type of nanoparticles have a sequence complementary to that of the oligonucleotides on the first type of nanoparticles. The nanoparticle-oligonucleotide conjugates are equated under conditions effective to allow hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to each other so that a desired nanomaterial or nanostructure is formed wherein the nanoparticles are held together by oligonucleotide connectors. Again, these hybridization conditions are well-known in the art and can be optimized for a particular nanofabrication scheme.

- 15 In both nanofabrication methods of the invention, the use of nanoparticles having one or more different types of oligonucleotides attached thereto is contemplated. The number of different oligonucleotides attached to a nanoparticle and the lengths and sequences of the one or more oligonucleotides will contribute to the rigidity and structural features of the resulting nanomaterials and nanostructures.

- Also, the size, shape and chemical composition of the nanoparticles will contribute to the properties of the resulting nanomaterials and nanostructures. These properties include optical properties, optoelectronic properties, electrochemical properties, electronic properties, stability in various solutions, pores and channel size variation, ability to separate bioactive molecules while acting as a filter, etc. The use of mixtures of nanoparticles having different sizes, shapes and/or chemical compositions, as well as the use of nanoparticles having uniform sizes, shapes and chemical composition, are contemplated.

- 25 In either fabrication method, the nanoparticles in the resulting nanomaterial or nanostructure are held together by oligonucleotide connectors. The sequences, lengths, and strandness of the oligonucleotide connectors, and the number of

WO 01/065

PCT/JP98/01390

different oligonucleotide connectors present will contribute to the rigidity and structural properties of the nanomaterial or nanostructure. If an oligonucleotide connector is partially double-stranded, its rigidity can be increased by the use of a linker oligonucleotide as described above in connection with the method of detecting nucleic acid. The rigidity of a completely double-stranded oligonucleotide connector can be increased by the use of one or more reinforcing oligonucleotides having complementary sequences so that they bind to the double-stranded oligonucleotide connector to form triple-stranded oligonucleotide connectors. The use of quadruple-stranded oligonucleotide connectors based on deoxyguanosine or deoxycytidine quaterns is also contemplated.

Several of a variety of systems for organizing nanoparticles based on oligonucleotide hybridization are illustrated in the figures. In a simple system (Figure 1) one set of nanoparticles bears oligonucleotides with a defined sequence and another set of nanoparticles bears oligonucleotides with a complementary sequence. On mixing the two sets of nanoparticle-oligonucleotide conjugates under hybridization conditions, the two types of particles are linked by double stranded oligonucleotide connectors which serve as spacers to position the nanoparticles at selected distances.

An attractive system for spacing nanoparticles involves the addition of one free linking oligonucleotide as illustrated in Figure 2. The sequence of the linking oligonucleotide will have at least a first portion and a second portion for binding to oligonucleotides on nanoparticles. This system is basically the same as utilized in the nucleic acid detection method, except that the length of the added linking oligonucleotide can be selected to be equal to the combined lengths of oligonucleotides attached to the nanoparticles. The related system illustrated in Figure 3 provides a convenient means to tailor the distance between nanoparticles without having to change the sets of nanoparticle-oligonucleotide conjugates employed.

A further elaboration of the scheme for creating defined spaces between nanoparticles is illustrated in Figure 4. In this case a double stranded segment of DNA or RNA containing overhanging ends is employed as the linking oligonucleotide. Hybridization of the single-stranded, overhanging segments of the

WO 03/01665

ECTEST001150

linking oligonucleotide with the oligonucleotides attached to the nanoparticles affords multiple double-stranded oligonucleotide cross-links between the nanoparticles.

Stiffer nanomaterials and nanostructures, or portions thereof, can be generated by employing triple-stranded oligonucleotide connectors between nanoparticles. In

- 5 forming the triple strand, one may exploit either the pyrimidine-purine-pyrimidine motif (Moore, H.E. and Dervan, P.B. *Science*, 238, 645-650 (1987)) or the purine-purine-pyrimidine motif (Pritch, D.S. et al. *Biochemistry*, 30, 6081-6087 (1991)).

- 10 An example of the organization of nanoparticles by generating triple-stranded connectors by the pyrimidine-purine-pyrimidine motif are illustrated in Figure 10. In the system shown in Figure 10, one set of nanoparticles is conjugated with a defined strand containing pyrimidine nucleotides and the other set is conjugated with a complementary oligonucleotide containing purine nucleotides. Attachment of the oligonucleotides is designed such that the nanoparticles are separated by the double-

- 15 strand oligonucleotide formed on hybridization. Thus, a free pyrimidine oligonucleotide with an orientation opposite that for the pyrimidine strand linked to the nanoparticle is added to the system prior to, simultaneously with, or just subsequent to mixing the nanoparticles. Since the third strand in this system is held by Hoogsteen base pairing, the triple strand is relatively unstable thermally. Covalent bridges spanning the breadth of the duplex are known to stabilize triple-stranded complexes (Salzberg, M., Wu, T., Letsinger, R.L., *J. Am. Chem. Soc.* 114, 8768-8772, (1992); Letsinger, R.L. and Wu, T. *J. Am. Chem. Soc.* 117, 7323-7328 (1995); Prabhakar, G. and Kool, J. *Am. Chem. Soc.*, 114, 3523-3527 (1992)).

For construction of nanomaterials and nanostructures, it may be desirable in some cases to "lock" the assembly in place by covalent cross-links after formation of

- 25 the nanomaterial or nanostructure by hybridization of the oligonucleotide components. This can be accomplished by incorporating functional groups that undergo a triggered (irreversible) reaction into the oligonucleotides. An example of a functional group for this purpose is a silylbenzylcarboxamide group. It has been demonstrated that two silylbenzylcarboxamide groups aligned within hybridized oligonucleotides readily undergo cross-linking on irradiation with ultraviolet light (340 nm) (Lewin, F.D. et al. (1995) *J. Am. Chem. Soc.* 117, 8785-8792).
- 30

WO 01/51665

PCT/US98/01990

Alternatively, one could employ the displacement of a 5'-O-tosyl group from an oligonucleotide, held at the 3'-position to a nanoparticle by a mercaptosilyl group, with a thiophosphoryl group or the 3'-end of an oligonucleotide held to a nanoparticle by a mercaptosilyl group. In the presence of an oligonucleotide that hybridizes to both oligonucleotides and, thereby, brings the thiophosphoryl group into proximity of the tosyl group, the tosyl group will be displaced by the thiophosphoryl group, generating an oligonucleotide linked at the ends to two different nanoparticles. For displacement reactions of this type, see Horlein et al., *J. Am. Chem. Soc.*, 117, 10151-10152 (1995). The fact that thiophosphoryl oligonucleotides do not react with gold nanoparticles under the conditions employed in attaching mercaptosilyl-oligonucleotides to gold nanoparticles enables one to prepare gold nanoparticle-oligonucleotide conjugates anchored through the mercapto group to the nanoparticles and containing a terminal thiophosphoryl group free for the coupling reaction.

A related coupling reaction to lock the assembled nanoparticle system in place utilizes displacement of bromide from a terminal bromoacetylaminonucleoside by a terminal thiophosphoryl-oligonucleotide as described in Oryanov and Letsinger, *J. Am. Chem. Soc.*, 116, 3808. This reaction proceeds much like the displacement of tosylate described above, except that the reaction is faster. Nanoparticles bearing oligonucleotides terminated with thiophosphoryl groups are prepared as described above. For preparation of nanoparticles bearing oligonucleotides terminated with bromoacetyl amino groups, one first prepares an oligonucleotide terminated at one end by an aminonucleoside (e.g., either 3'-amino-3'-deoxythymidine or 3'-amino-3'-deoxythymidine) and at the other end by a mercaptosilyl group. Molecules of this oligonucleotide are then anchored to the nanoparticle through the mercapto groups, and the nanoparticle-oligonucleotide conjugate is then converted the 3'-bromoacetyl amino derivative by reaction with a bromoacetyl acylating agent.

A fourth coupling scheme to lock the assemblies in place utilizes oxidation of nanoparticles bearing oligonucleotides terminated by thiophosphoryl groups. Mild oxidizing agents, such as potassium triiodide, potassium ferricyanide (see Oryanov and Letsinger, *Nucleic Acids Research*, 11, 1403) or oxygen, are preferred.

WO 01/51665

PCT/US98/01350

In addition, the properties of the nanomaterials and nanostructures can be altered by incorporating into the interconnecting oligonucleotide chains organic and inorganic functions that are held in place by covalent attachment to the oligonucleotide chains. A wide variety of backbone, base and sugar modifications are well known (see for example Chinman, E. and Peyman, A. *Chemical Reviews*, **90**, 544-584 (1990)). Also, the oligonucleotide chains could be replaced by "Peptide Nucleic Acid" chains (PNA), in which the nucleotide bases are held by a polypeptide backbone (see Wittung, P. et al., *Nature*, **368**, 561-563 (1994)).

As can be seen from the foregoing, the nanofabrication method of the invention is extremely versatile. By varying the length, sequence and strandness of the linking oligonucleotides, the number, length, and sequence of the binding portions of the linking oligonucleotides, the length, sequence and number of the oligonucleotides attached to the nanoparticles, the size, shape and chemical composition of the nanoparticles, the number and types of different linking oligonucleotides and nanoparticles used, and the strandness of the oligonucleotide connections, nanomaterials and nanostructures having a wide range of structures and properties can be prepared. These structures and properties can be varied further by cross-linking of the oligonucleotide connectors, by functionalizing the oligonucleotides, by backbone, base or sugar modifications of the oligonucleotides, or by the use of peptide-nucleic acids.

The nanomaterials and nanostructures that can be made by the nanofabrication method of the invention include nanoscale mechanical devices, separation membranes, bio-filters, and biosensors. It is contemplated that the nanomaterials and nanostructures of the invention can be used as chemical sensors, in computers, for drug delivery, for protein engineering, and as templates for biotechnology/nanotechnology fabrication/directed assembly of other structures. See generally Searson et al., *New J. Chem.*, **17**, 735 (1993) for other possible applications. The nanomaterials and nanostructures that can be made by the nanofabrication method of the invention also can include electronic devices. Whether nucleic acids could transport electrons has been the subject of substantial controversy. As shown in Example 21 below,

WO 01/51655

PC/TUS00/01390

nanoparticles assembled by DNA conduct electricity (the DNA connectors function as semiconductors).

Finally, the invention provides methods of making unique nanoparticle-oligonucleotide conjugates. In the first such method, oligonucleotides are bound to charged nanoparticles to produce stable nanoparticle-oligonucleotide conjugates.

Charged nanoparticles include nanoparticles made of metal, such as gold nanoparticles.

The method comprises providing oligonucleotides having covalently bound thereto a moiety comprising a functional group which can bind to the nanoparticles.

- 10 The moieties and functional groups are those described above for binding (i.e., by chemisorption or covalent bonding) oligonucleotides to nanoparticles. For instance, oligonucleotides having an alkanethiol, an alkanedisulfide or a cyclic disulfide covalently bound to their 5' or 3' ends can be used to bind the oligonucleotides to a variety of nanoparticles, including gold nanoparticles.

- 15 The oligonucleotides are contacted with the nanoparticles in water for a time sufficient to allow at least some of the oligonucleotides to bind to the nanoparticles by means of the functional groups. Such times can be determined empirically. For instance, it has been found that a time of about 12-24 hours gives good results. Other suitable conditions for binding of the oligonucleotides can also be determined empirically. For instance, a concentration of about 10-20 nM nanoparticles and incubation at room temperature gives good results.

- 20 Next, at least one salt is added to the water to form a salt solution. The salt can be any water-soluble salt. For instance, the salt may be sodium chloride, magnesium chloride, potassium chloride, ammonium chloride, sodium acetate, ammonium acetate, a combination of two or more of these salts, or one of these salts in phosphate buffer. Preferably, the salt is added as a concentrated solution, but it could be added as a solid. The salt can be added to the water all at one time or the salt is added gradually over time. By "gradually over time" is meant that the salt is added in at least two portions at intervals spaced apart by a period of time. Suitable time intervals can be determined empirically.

WU 018555

ECTUS00011793

The ionic strength of the salt solution must be sufficient to overcome at least partially the electrostatic repulsion of the oligonucleotides from each other and, either the electrostatic attraction of the negatively-charged oligonucleotides for positively-charged nanoparticles, or the electrostatic repulsion of the negatively-charged

- 5 oligonucleotides from negatively-charged nanoparticles. Gradually reducing the electrostatic attraction and repulsion by adding the salt gradually over time has been found to give the highest surface density of oligonucleotides on the nanoparticles. Suitable ionic strengths can be determined empirically for each salt or combination of salts. A final concentration of sodium chloride of from about 0.1 M to about 1.0 M is
- 10 phosphate buffer, preferably with the concentration of sodium chloride being increased gradually over time, has been found to give good results.

- After adding the salt, the oligonucleotides and nanoparticles are incubated in the salt solution for an additional period of time sufficient to allow sufficient additional oligonucleotides to bind to the nanoparticles to produce the stable
- 15 nanoparticle-oligonucleotide conjugates. As will be described in detail below, an increased surface density of the oligonucleotides on the nanoparticles has been found to stabilize the conjugates. The time of this incubation can be determined empirically. A total incubation time of about 24-48, preferably 40 hours, has been found to give good results (this is the total time of incubation; as noted above, the salt concentration
- 20 can be increased gradually over this total time). This second period of incubation in the salt solution is referred to herein as the "aging" step. Other suitable conditions for this "aging" step can also be determined empirically. For instance, incubation at room temperature and pH 7.0 gives good results.

- The conjugates produced by use of the "aging" step have been found to be
- 25 considerably more stable than those produced without the "aging" step. As noted above, this increased stability is due to the increased density of the oligonucleotides on the surfaces of the nanoparticles which is achieved by the "aging" step. The surface density achieved by the "aging" step will depend on the size and type of nanoparticles and on the length, sequence and concentration of the oligonucleotides.
- 30 A surface density adequate to make the nanoparticles stable and the conditions necessary to obtain it for a desired combination of nanoparticles and oligonucleotides

WU 01/01165

ECT/ASHUR/1701

can be determined empirically. Generally, a surface density of at least 10 picomoles/cm² will be adequate to provide stable nanoparticle-oligonucleotide conjugates. Preferably, the surface density is at least 15 picomoles/cm². Since the ability of the oligonucleotides of the conjugates to hybridize with nucleic acid and oligonucleotide targets can be diminished if the surface density is too great, the surface density is preferably no greater than about 35-40 picomoles/cm².

As used herein, "stable" means that, for a period of at least six months after the conjugates are made, a majority of the oligonucleotides remain attached to the nanoparticles and the oligonucleotides are able to hybridize with nucleic acid and oligonucleotide targets under standard conditions encountered in methods of detecting nucleic acid and methods of nanofabrication.

Aside from their stability, the nanoparticle-oligonucleotide conjugates made by this method exhibit other remarkable properties. See, e.g., Examples 5, 7, and 19 of the present application. In particular, due to the high surface density of the conjugates, they will assemble into large aggregates in the presence of a target nucleic acid or oligonucleotide. The temperature over which the aggregates form and dissociate has unexpectedly been found to be quite narrow, and this unique feature has important practical consequences. In particular, it increases the selectivity and sensitivity of the methods of detection of the present invention. A single base mismatch and as little as 20 basepairs of target can be detected using the conjugates. Although these features were originally discovered in assays performed in solution, the advantages of the use of these conjugates have been found to extend to assays performed on substrates, including those in which only a single type of conjugate is used.

It has been found that the hybridization efficiency of nanoparticle-oligonucleotide conjugates can be increased dramatically by the use of recognition oligonucleotides which comprise a recognition portion and a spacer portion. "Recognition oligonucleotides" are oligonucleotides which comprise a sequence complementary to at least a portion of the sequence of a nucleic acid or oligonucleotide target. In this embodiment, the recognition oligonucleotides comprise a recognition portion and a spacer portion, and it is the recognition portion which

WU 0036165

PCT/JP99/01996

- hybridizes to the nucleic acid or oligonucleotide target. The spacer portion of the recognition oligonucleotide is designed so that it can bind to the nanoparticles. For instance, the spacer portion could have a moiety covalently bound to it, the moiety comprising a functional group which can bind to the nanoparticles. There are the same moieties and functional groups as described above. As a result of the binding of the spacer portion of the recognition oligonucleotide to the nanoparticles, the recognition portion is spaced away from the surface of the nanoparticles and is more accessible for hybridization with its target. The length and sequence of the spacer portion providing good spacing of the recognition portion away from the
- nanoparticles can be determined empirically. It has been found that a spacer portion comprising at least about 10 nucleotides, preferably 10-30 nucleotides, gives good results. The spacer portion may have any sequence which does not interfere with the ability of the recognition oligonucleotides to become bound to the nanoparticles or to a nucleic acid or oligonucleotide target. For instance, the spacer portions should not be sequences complementary to each other, to that of the recognition oligonucleotides, or to that of the nucleic acid or oligonucleotide target of the recognition oligonucleotides. Preferably, the bases of the nucleotides of the spacer portion are all adenines, all thymines, all cytidines, or all guanines, unless this would cause one of the problems just mentioned. More preferably, the bases are all adenines or all thymines. Most preferably the bases are all thymines.
- It has further been found that the use of diluent oligonucleotides in addition to recognition oligonucleotides provides a means of tailoring the conjugates to give a desired level of hybridization. The diluent and recognition oligonucleotides have been found to attach to the nanoparticles in about the same proportion as their ratio in the solution contacted with the nanoparticles to prepare the conjugates. Thus, the ratio of the diluent to recognition oligonucleotides bound to the nanoparticles can be controlled so that the conjugates will participate in a desired number of hybridization events. The diluent oligonucleotides may have any sequence which does not interfere with the ability of the recognition oligonucleotides to be bound to the nanoparticles or to bind to a nucleic acid or oligonucleotide target. For instance, the diluent oligonucleotides should not have a sequence complementary to that of the recognition

WO 01/05155

PC/T2000/01159

oligonucleotides or to that of the nucleic acid or oligonucleotide target of the recognition oligonucleotides. The diluent oligonucleotides are also preferably of a length shorter than that of the recognition oligonucleotides so that the recognition oligonucleotides can bind to their nucleic acid or oligonucleotide targets. If the recognition oligonucleotides complete spacer portions, the diluent oligonucleotides are, most preferably, about the same length as the spacer portions. In this manner, the diluent oligonucleotides do not interfere with the ability of the recognition portions of the recognition oligonucleotides to hybridize with nucleic acid or oligonucleotide targets. Even more preferably, the diluent oligonucleotides have the same sequence as the sequence of the spacer portions of the recognition oligonucleotides.

As can be readily appreciated, highly desirable nanoparticle-oligonucleotide conjugates can be prepared by employing all of the methods described above. By doing so, stable conjugates with tailored hybridization abilities can be produced.

Any of the above conjugates can be, and are preferably, used in any of the methods of detecting nucleic acids described above, and the invention also provides a kit comprising a container holding any of the above conjugates. In addition, the conjugates can be, and are preferably, used in any of the methods of nucleic acid detection of the invention and the method of separating nucleic acids.

It is to be noted that the term "a" or "an" entity refers to one or more of that entity. For example, "a characteristic" refers to one or more characteristics or at least one characteristic. As such, the terms "a" (or "an"), "one or more" and "at least one" are used interchangeably herein. It is also to be noted that the terms "comprising", "including", and "having" have been used interchangeably.

WU 0186645

PCT/JP00/011100

EXAMPLES

Example 1: Preparation of Oligonucleotide-Modified Gold NanoparticlesA. Preparation Of Gold Nanoparticles

- 5 Gold colloids (13 nm diameter) were prepared by reduction of HAuCl_4 with citrate as described in Frens, *Nature Phys. Sci.*, 241, 20 (1973) and Graham, *Anal. Chem.*, 67, 735 (1995). Briefly, all glassware was cleaned in aqueous regia (3 parts HCl , 1 part HNO_3), rinsed with Nanopure H_2O , then oven dried prior to use. HAuCl_4 and sodium citrate were purchased from Aldrich Chemical Company. Aqueous HAuCl_4 (1 mM, 500
- 10 mL) was brought to reflux while stirring. Then, 38.8 mM sodium citrate (50 mL) was added quickly. The solution color changed from pale yellow to burgundy, and refluxing was continued for 15 min. After cooling to room temperature, the red solution was filtered through a Micron Separations Inc. 1 micron filter. Au colloids were characterized by UV-vis spectroscopy using a Hewlett Packard 8452A diode array
- 15 spectrophotometer and by Transmission Electron Microscopy (TEM) using a Hitachi 8100 transmission electron microscope. Gold particles with diameters of 13 nm will produce a visible color change when aggregated with target and probe oligonucleotide sequences in the 10-35 nucleotide range.

B. Synthesis Of Oligonucleotides

- 20 Oligonucleotides were synthesized on a 1 micromole scale using a Milligene Expedite DNA synthesizer in single column mode using phosphoramidite chemistry. Fekstein, F. (ed.) *Oligonucleotides and Analogs: A Practical Approach* (IRL Press, Oxford, 1991). All solutions were purchased from Milligene (DNA synthesist grade). Average coupling efficiency varied from 98 to 99.8%, and the final dimethoxytrityl (DMT) protecting group was not cleaved from the oligonucleotides to aid in purification.
- 25 For 3'-thiol-oligonucleotides, Thiol-Modifier C3 5'-S CPG support was purchased from Glen Research and used in the automated synthesizer. During terminal cleavage from the solid support (16 hr at 55° C), 0.05 M dithiothreitol (DTT) was added to the

WU 8165165

PC/TZSH/03/010

NH₄OH solution to reduce the 3' disulfide to the thiol. Before purification by reverse phase high pressure liquid chromatography (HPLC), excess DTT was removed by extraction with ethyl acetate.

- For 5'-thiol oligonucleotides, 5'-Thiol-Modifier C₆-phosphoramidite reagent was purchased from Glen Research, 44001 Falcon Place, Sterling, Va 20166. The oligonucleotides were synthesized, and the final DMT protecting group removed. Then, 1 ml of dry acetonitrile was added to 100 pmole of the 5'-Thiol Modifier C₆-phosphoramidite. 200 µl of the amidite solution and 200 µl of activator (fresh from synthesis) were mixed and introduced onto the column containing the synthesized oligonucleotides still on the solid support by syringe and pumped back and forth through the column for 10 minutes. The support was then washed (2 x 1 mL) with dry acetonitrile for 30 seconds. 700 µl of a 0.016 M I₂/H₂O/pyridine mixture (oxidizer solution) was introduced into the column, and was then pumped back and forth through the column with two syringes for 30 seconds. The support was then washed with a 1:1 mixture of CH₃CN/pyridine (2 x 1 mL) for 1 minute, followed by a final wash with dry acetonitrile (2 x 1 mL) with subsequent drying of the column with a stream of nitrogen. The trityl protecting group was not removed, which aids in purification.

- Reverse phase HPLC was performed with a Dionex, DX500 system equipped with a Hewlett Packard ODS hyperval column (4.6 x 200 mm, 5 µm particle size) using 0.03 M R₄NH⁺ OAc buffer (TEAA), pH 7, with a 1%/min gradient of 99% CH₃CN/99% TEAA. The flow rate was 1 mL/min, with UV detection at 260 nm. Preparative HPLC was used to purify the DMT-protected unmodified oligonucleotides (elution at 27 min). After collection and evaporation of the buffer, the DMT was cleaved from the oligonucleotides by treatment with 80% acetic acid for 30 min at room temperature. The solution was then evaporated to near dryness, water was added, and the cleaved DMT was extracted from the aqueous oligonucleotide solution using ethyl acetate. The amount of oligonucleotide was determined by absorbance at 260 nm, and final purity assessed by reverse phase HPLC (elution time 14.5 minutes).

WO 01/51555

PCT/US98/1798

The same protocol was used for purification of the 3'-thiol oligonucleotides, except that DTT was added after extraction of DMF to reduce the amount of disulfide formed. After six hours at 40°C, the DTT was extracted using ethyl acetate, and the oligonucleotides repurified by HPLC (elution time 15 minutes).

- 5 For purification of the 5'-thiol modified oligonucleotides, preparatory HPLC was performed under the same conditions as for unmodified oligonucleotides. After purification, the t-buty protecting group was removed by adding 150 μ L of a 50 mM AgNO_3 solution to the dry oligonucleotide sample. The sample turned a milky white color as the cleavage occurred. After 30 minutes, 200 μ L of a 10 mg/ml solution of DTT was added to complex the Ag (five minute reaction time), and the sample was centrifuged to precipitate the yellow complex. The oligonucleotide solution (<50 OD) was then transferred onto a desalting NAP-5 column (Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) for purification (contains DNA Grade Sephadex G-25 Medium for desalting and buffer exchange of oligonucleotides greater than 10 bases). The amount of 5'-thiol modified oligonucleotide was determined by UV-vis spectroscopy by measuring the magnitude of the absorbance at 260 nm. The final purity was assessed by performing ion-exchange HPLC with a Dionex Nucleopak PA-100 (4 x 250) column using a 10 mM NaOH solution (pH 12) with a 25%/min gradient of 10 mM NaOH, 1M NaCl solution. Typically, two peaks resulted with elution times of approximately 19 minutes and 25 minutes (elution times are dependent on the length of the oligonucleotide strand). These peaks corresponded to the thiol and the disulfide oligonucleotides respectively.

C. Attachment Of Oligonucleotides To Gold Nanoparticles

- An aqueous solution of 10nM (150 μ L) Au colloids, prepared as described in part A above, was mixed with 3.75 μ M (46 μ L) 3'-thiol-TTTOCTGA, prepared as described in part B and allowed to stand for 24 hours at room temperature in 1 ml Eppendorf capped vials. A second solution of colloids was reacted with 3.75 μ M (46 μ L) 3'-thiol-TACGGTTG. Note that these oligonucleotides are noncomplementary. Shortly before use, equal amounts of each of the two nanoparticle solutions were combined. Since the

WO 01/51655

PCT/US98/01390

oligonucleotides are noncomplementary, no reaction took place.

The oligonucleotide-modified nanoparticles are stable at elevated temperatures (80°C) and high salt concentrations (1M NaCl) for days and have not been observed to undergo particle growth. Stability in high salt concentrations is important, since such conditions are required for the hybridization reactions that form the basis of the methods of detection and nanofabrication of the invention.

Example 1: Formation Of Nanoparticle Assemblies

A. Preparation Of Linking Oligonucleotide

Two (nonthiolated) oligonucleotides were synthesized as described in part B of

Example 1. They had the following sequences:

3' ATATGCGCGA TCTCAGC AAA (SEQ ID NO:1); and

3' GATCGCGCAT ATCAACGGTA (SEQ ID NO:2).

Mixing of these two oligonucleotides in a 1 M NaCl, 10 mM phosphate buffered (pH 7.0) solution, resulted in hybridization to form a duplex having a 12-base-pair overlap and two 8-base-pair sticky ends. Each of the sticky ends had a sequence which was complementary to that of one of the oligonucleotides attached to the Au colloid prepared in part C of Example 1.

B. Formation Of Nanoparticle Assemblies

The linking oligonucleotides prepared in part A of this example (0.17 μ M final concentration after dilution with NaCl) were added to the nanoparticle-oligonucleotide conjugates prepared in part C of Example 1 (5.1 mM final concentration after dilution with NaCl) at room temperature. The solution was then diluted with aqueous NaCl (to a final concentration of 1 M) and buffered at pH 7 with 10 mM phosphate, conditions which are suitable for hybridization of the oligonucleotides. An immediate color change from red to purple was observed, and a precipitation reaction ensued. See Figure 6. Over the course of several hours, the solution became clear and a pinkish-gray precipitate settled to the bottom of the reaction vessel. See Figure 6.

WU 915165

PC1705H181790

To verify that this process involved both the oligonucleotides and colloids, the precipitate was collected and resuspended (by shaking) in 1 M aqueous NaCl buffered at pH 7. Any of the oligonucleotides not hybridized to the nanoparticles are removed in this manner. Then, a temperature/time dissociation experiment was performed by monitoring the characteristic absorbance for the hybridized oligodeoxynucleotides (260 nm) and for the aggregated colloids which is reflective of the gold interparticle distance (700 nm). See Figure 7.

Changes in absorbance at 260 and 700 nm were recorded on a Perkin-Elmer Lambda 2 UV-vis Spectrophotometer using a Peltier FTP-1 Temperature Controlled Cell Holder while cycling the temperature at a rate of 1°C/minute between 0°C and 80°C. DNA solutions were approximately 1 absorbance unit(6) (OD), buffered at pH 7 using 10 mM phosphate buffer and at 1M NaCl concentration.

The results are shown in Figure 8A. As the temperature was cycled between 0°C and 80°C (which is 38°C above the dissociation temperature (T_m) for the duplex ($T_m=42$ °C)), there was an excellent correlation between the optical signatures for both the colloids and oligonucleotides. The UV-vis spectrum for naked Au colloids was much less temperature dependent, Figure 8B.

There was a substantial visible optical change when the polymeric oligonucleotide-colloid precipitate was heated above its melting point. The clear solution turned dark red as the polymeric biomaterial de-hybridized to generate the unlinked colloids which are soluble in the aqueous solution. The process was reversible, as evidenced by the temperature traces in Figure 8A.

In a control experiment, a 14-7-14-A duplex was shown to be ineffective at inducing reversible Au colloid particle aggregation. In another control experiment, a linking oligonucleotide duplex with five base pair mismatches in the sticky ends was found not to induce reversible particle aggregation of oligonucleotide-modified nanoparticles (prepared as described in part C of Example 1 and reacted as described above). In a third control experiment, non-thiolated oligonucleotides having sequences

WO 03/05165

PCT/US01/170

complementary to the sticky ends of the linking oligonucleotide and reacted with nanoparticles did not produce reversible aggregation when the nanoparticles were combined with the linking oligonucleotide.

Further evidence of the polymerization/assembly process came from

- 5 Transmission Electron Microscopy (TEM) studies of the precipitate. TEM was performed on a Hitachi 8100 Transmission Electron Microscope. A typical sample was prepared by dropping 100 μ L of colloid solution onto a holey carbon grid. The grid, then, was dried under vacuum and imaged. TEM images of Au colloids linked by hybridized oligonucleotides showed large assembled networks of the Au colloids, Figure 9A. Naked Au colloids do not aggregate under comparable conditions but either disperse or undergo particle growth reactions. Hayat, *Colloidal Gold: Principles, Methods, and Applications* (Academic Press, San Diego, 1991). Note that there is no evidence of colloid particle growth in the experiments performed to date; the hybridized colloids seem to be remarkably regular in size with an average diameter of 13 nm.
- 15 With TEM, a superposition of layers is obtained, making it difficult to assess the degree of order for three-dimensional aggregates. However, smaller scale images of single layer, two-dimensional aggregates provided more evidence for the self-assembly process, Figure 9B. Close-packed assemblies of the aggregates with uniform particle separations of approximately 60 Å can be seen. This distance is somewhat shorter than the estimated 95 Å spacing expected for colloids connected by rigid oligonucleotide hybrids with the sequences that were used. However, because of the nicks in the duplex obtained after hybridization of the oligonucleotides on the nanoparticles to the linking oligonucleotides, these were not rigid hybrids and were quite flexible. It should be noted that this is a variable that can be controlled by reducing the system from four overlapping strands to three (thereby reducing the number of nicks) or by using triplexes instead of
- 20 duplexes.
- 25

Example 3: Preparation of Oligonucleotide-Modified Gold Nanoparticles

WU 09/31/65

PC 07/09/03/03

Gold colloids (13 nm diameter) were prepared as described in Example 1. Thiol-oligonucleotides [HS(CH₂)₆OP(O)(O⁻)-oligonucleotide] were also prepared as described in Example 1.

The method of attaching thiol-oligonucleotides to gold nanoparticles described in

- 5 Example 1 was found not to produce satisfactory results in some cases. In particular, when long oligonucleotides were used, the oligonucleotide-colloid conjugates were not stable in the presence of a large excess of high molecular weight salmon sperm DNA used as model for the background DNA that would normally be present in a diagnostic system. Longer exposure of the colloids to the thiol-oligonucleotides produced

- 10 oligonucleotide-colloid conjugates that were stable to salmon sperm DNA, but the resulting conjugates failed to hybridize satisfactorily. Further experimentation led to the following procedure for attaching thiol-oligonucleotides of any length to gold colloids so that the conjugates are stable to high molecular weight DNA and hybridize satisfactorily.

A 1 mL solution of the gold colloids (17nM) in water was mixed with excess

- 15 (3.68-34) thiol-oligonucleotides (28 bases in length) in water, and the mixture was allowed to stand for 12-24 hours at room temperature. Then, 100 μ L of a 0.1 M sodium hydrogen phosphate buffer, pH 7.0, and 100 μ L of 1.0 M NaCl were premixed and added. After 10 minutes, 10 μ L of 1% aqueous NaN₃ were added, and the mixture was allowed to stand for an additional 40 hours. This "aging" step was designed to increase
- 20 the surface coverage by the thiol-oligonucleotides and to displace oligonucleotide bases from the gold surface. Somewhat cleaner, better defined red spots in subsequent assays were obtained if the solution was frozen in a dry-ice bath after the 40-hour incubation and then thawed at room temperature. Either way, the solution was next centrifuged at 14,000 rpm in an Eppendorf Centrifuge 5414 for about 15 minutes to give a very pale pink supernatant containing most of the oligonucleotide (as indicated by the absorbance at 260 nm) along with 7-10% of the colloidal gold (as indicated by the absorbance at 520 nm), and a compact, dark, gelatinous residue at the bottom of the tube. The supernatant
- 25 was removed, and the residue was resuspended in about 200 μ L of buffer (10 mM

WO 03/055

PC/PUSHEB100

phosphate, 0.1 M NaCl) and recentrifuged. After removal of the supernatant solution, the residue was taken up in 1.0 mL of buffer (10 mM phosphate, 0.1 M NaCl) and 10 μ L of a 1% aqueous solution of NaN₃. Dissolution was assisted by drawing the solution into, and expelling it from, a pipette several times. The resulting red master solution was stable (i.e., remained red and did not aggregate) on standing for months at room temperature, on spotting on silica thin layer chromatography (TLC) plates (see Example 6), and on addition to 2 M NaCl, 10 mM MgCl₂, or solutions containing high concentrations of sodium sperm DNA.

10 Example 4: Acceleration Of Hybridization of Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates

The oligonucleotide-gold colloid conjugates I and II illustrated in Figure 11 were prepared as described in Example 3. The hybridization of these two conjugates was extremely slow. In particular, mixing samples of conjugates I and II in aqueous 0.1 M NaCl or in 10 mM MgCl₂ plus 0.1 M NaCl and allowing the mixture to stand at room temperature for a day produced little or no color change.

Two ways were found to improve hybridization. First, faster results were obtained by freezing the mixture of conjugates I and II (each 15 nM contained in a solution of 0.1 M NaCl) in a dry ice-isopropyl alcohol bath for 5 minutes and then thawing the mixture at room temperature. The thawed solution exhibited a bluish color. When 1 μ L of the solution was spotted on a standard C-18 TLC silica plate (Alltech Associates), a strong blue color was seen immediately. The hybridization and consequent color change caused by the freeze-thawing procedure were reversible. On heating the hybridized solution to 80°C, the solution turned red and produced a pink spot on a TLC plate. Subsequent freezing and thawing returned the system to the (blue) hybridized state (both solution and spot on a C-18 TLC plate). In a similar experiment in which the solution was not refrozen, the spot obtained on the C-18 TLC plate was pink.

A second way to obtain faster results is to warm the conjugates and target. For

WU 8051665

PCT/US98/01300

histamine, in another experiment, oligonucleotide-gold colloid conjugates and an oligonucleotide target sequence in a 0.1 M NaCl solution were warmed rapidly to 65°C and allowed to cool to room temperature over a period of 20 minutes. On spotting on a C-18 silicon plate and drying, a blue spot indicative of hybridization was obtained. In contrast, incubation of the conjugates and target at room temperature for an hour in 0.1 M NaCl solution did not produce a blue color indicative of hybridization. Hybridization is more rapid in 0.3 M NaCl.

Example 5: Assays Using Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates

- 10 The oligonucleotide-gold colloid conjugates 1 and 2 illustrated in Figures 12A-F were prepared as described in Example 3, and the oligonucleotide target 3 illustrated in Figure 12A was prepared as described in Example 2. Mismatched and deletion targets 4, 5, 6, and 7 were purchased from the Northwestern University Biotechnology Facility, Chicago, IL. These oligonucleotides were synthesized on a 40 nmol scale and purified on an reverse phase C18 cartridge (DPC). Their purity was determined by performing ion exchange HPLC.

- 15 Selective hybridization was achieved by heating rapidly and then cooling rapidly to the stringent temperature. For example, hybridization was carried out in 100 μ L of 0.1 M NaCl plus 5 mM MgCl₂ containing 15 nM of each oligonucleotide-colloid conjugate 1 and 2, and 3 nanomoles of target oligonucleotide 3, 4, 5, 6, or 7, heating to 74°C, cooling to the temperatures indicated in Table 1 below, and incubating the mixture at this temperature for 10 minutes. A 3 μ L sample of each reaction mixture was then spotted on a C-18 TLC silica plate. On drying (5 minutes), a strong blue color appeared if hybridization had taken place.

- 25 The results are presented in Table 1 below. Pink spots signify a negative test (i.e., that the nanoparticles were not brought together by hybridization), and blue spots signify a positive test (i.e., that the nanoparticles were brought into proximity due to hybridization involving both of the oligonucleotide-colloid conjugates).

WO 01/51945

PC/TES/01/0130

TABLE 1

Reactants	Results (Color)			
	45°C	50°C	60°C	74°C
1 + 2	Pink	Pink	Pink	Pink
1 + 2 + 3 (mismatch)	Blue	Blue	Blue	Blue
1 + 2 + 4 (half complement mismatch)	Pink	Pink	Pink	Pink
1 + 2 + 5 (-d bp)	Blue	Pink	Pink	Pink
1 + 2 + 6 (1 bp mismatch)	Blue	Blue	Pink	Pink
1 + 2 + 7 (2 bp mismatch)	Pink	Pink	Pink	Pink

- 5 As can be seen in Table 1, hybridization at 60°C gave a blue spot only for the fully-matched target 3. Hybridization at 50°C yielded blue spots with both targets 3 and 6. Hybridization at 45°C gave blue spots with targets 3, 5 and 6.
- 10 In a related series, a target containing a single mismatch T nucleotide was found to give a positive test at 55°C (blue color) and a negative test (red color) at 64°C with conjugates 1 and 2. Under the same conditions, the fully-matched target (3) gave a positive test at both temperatures, showing that the test can discriminate between a target that is fully matched and one containing a single mismatched base.
- 15 Similar results were achieved using a different hybridization method. In particular, selective hybridization was achieved by freezing, thawing and then warming rapidly to the stringent temperature. For example, hybridization was carried out in 100 μ L of 0.1 M NaCl containing 15 nM of each oligonucleotide-colloid conjugate 1 and 2, and 10 picomoles of target oligonucleotide 3, 4, 5, 6, or 7, freezing in a dry ice-isopropyl alcohol bath for 3 minutes, thawing at room temperature, then warming rapidly to the temperatures indicated in Table 2 below, and incubating the mixture at this temperature for 10 minutes. A 3 μ L sample of each reaction mixture was then spotted on a C-18 TLC silica plate. The results are presented in Table 2.

WO 03/01665

PC/TUS/03/010

TABLE 2

Reagents (probes) + target	Results (color)			
	RT	39°C	49°C	64°C
(1 + 2) + 3	blue	blue	blue	blue
(1 + 2)	pink	pink	pink	pink
(1 + 2) + 4	pink	pink	pink	pink
(1 + 2) + 5	blue	blue	pink	pink
(1 + 2) + 6	blue	blue	blue	pink
(1 + 2) + 7	blue	pink	pink	pink

- 5 An important feature of these systems was that the color change associated with the temperature change was very sharp, occurring over a temperature range of about 1°C. This indicates high cooperativity in the melting and association processes involving the colloid conjugates and enables one to easily discriminate between oligonucleotide targets containing a fully-matched sequence and a single basepair mismatch.
- 10 The high degree of discrimination may be attributed to two features. The first is the alignment of two relatively short probe oligonucleotide segments (15 nucleotides) on the target is required for a positive signal. A mismatch in either segment is more destabilizing than a mismatch in a longer probe (e.g., an oligonucleotide 30 bases long) in a comparable two-component detection system. Second, the signal at 260 nm, obtained on hybridization of the target oligonucleotides with the nanoparticle conjugates in solution, is nanoparticle-based, not DNA-based. It depends on dissociation of an assembly of nanoparticles organized in a polymeric network by multiple oligonucleotide duplexes. This results in a narrowing of the temperature range that is observed for aggregate dissociation, as compared with annealed DNA thermal denaturation. In short, some duplexes in the crosslinked aggregates can dissociate without dispersing the nanoparticles into solution. Therefore, the temperature range for aggregate melting is very narrow (4°C) as compared with the temperature range associated with melting the comparable system without nanoparticles (12°C). Even more striking and advantageous
- 15
- 20

WO 01/61665

PC/DUS/HR/11/0

for this detection approach is the temperature range for the colorimetric response (<1°C) observe on the C18 silica plates. In principle, this three-component nanoparticle based strategy will be more selective than any two-component detection system based on a single-strand probe hybridizing with target nucleic acid.

- 5 A master solution containing 1 nmol of target 3 was prepared in 100 μ l of hybridization buffer (0.3 M NaCl, 10 mM phosphate, pH 7). One μ l of this solution corresponds to 10 picomole of target oligonucleotide. Serial dilutions were performed by taking an aliquot of the master solution and diluting it to the desired concentration with hybridization buffer. Table 3 shows the sensitivity obtained using 3 μ l of a mixture of
- 10 probes 1 and 2 with different amounts of target 3. After performing the hybridization using freeze-draw conditions, 3 μ l aliquots of these solutions were spotted onto C-18 TLC plates to determine color. In Table 3 below, pink signifies a negative test, and blue signifies a positive test.

15

TABLE 3

Amount of Target	Results
1 picomole	blue (positive)
200 femtomole	blue (positive)
100 femtomole	blue (positive)
20 femtomole	blue (positive)
10 femtomole	purple/pink (ambiguous)

This experiment indicates that 10 femtomoles is the lower limit of detection for this particular system.

20

Example 6: Assays Using Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates

DNA modified nanoparticles were adsorbed onto modified transparent substrates as shown in Figure 13B. This method involved the linking of DNA modified nanoparticles to nanoparticles that were attached to a glass substrate, using DNA hybridization interactions.

25

WO 01/01665

PCT/US98/0191

- Glass microscope slides were purchased from Fisher scientific. Slides were cut into approximately 5 x 15 mm pieces, using a diamond tipped scoring pen. Slides were cleaned by soaking for 20 minutes in a solution of 4:1 $H_2SO_4:H_2O_2$ at 50°C. Slides were then rinsed with copious amounts of water, then ethanol, and dried under a stream of dry nitrogen. To functionalize the slide surface with a thiol terminated silane, the slides were soaked in a degassed ethanol 1% (by volume) mercaptopropyl-trimethoxysilane solution for 12 hours. The slides were removed from the ethanol solution and rinsed with ethanol, then water. Nanoparticles were adsorbed onto the thiol terminated surface of the slides by soaking in solutions containing the 13 nm diameter gold nanoparticles (preparation described in Example 1). After 12 hours in the colloidal solutions, the slides were removed and rinsed with water. The resulting slides have a pink appearance due to the adsorbed nanoparticles and exhibit similar UV-vis absorbance profiles (surface plasmon absorbance peak at 520 nm) as the aqueous gold nanoparticle colloidal solutions. See Figure 14A.
- DNA was attached to the nanoparticle modified surface by soaking the glass slides in 0.2 OD (1.7 μM) solution containing freshly purified 3' thiol oligonucleotide (3' thiol ATGCTCAACTCT [SEQ ID NO:33]) (synthesized as described in Examples 1 and 3). After 12 hours of soaking time, the slides were removed and rinsed with water.
- To demonstrate the ability of an analyte DNA strand to bind nanoparticles to the modified substrate, a linking oligonucleotide was prepared. The linking oligonucleotide (prepared as described in Example 2) was 34 bp long (5' TACGAGTTGAGAATCCTGAAATGCG [SEQ ID NO:34]) with a sequence containing a 12 bp end that was complementary to the DNA already adsorbed onto the substrate surface (SEQ ID NO:33). The substrate was then soaked in a hybridization buffer (0.4 M NaCl, 10 mM phosphate buffer pH 7) solution containing the linking oligonucleotide (0.4 OD, 1.7 μM) for 12 hours. After removal and rinsing with similar buffer, the substrate was soaked in a solution containing 13 nm diameter gold nanoparticles which had been modified with an oligonucleotide (TAGGACTTACGC 5' thiol [SEQ ID NO:35])

WG 916165

PCT/US01/0199

(prepared as described in Example 3) that is complementary to the unhybridized portion of the linking oligonucleotide attached to the substrate. After 12 hours of soaking, the substrate was removed and rinsed with the hybridization buffer. The substrate color had darkened to a purple color and the UV-vis absorbance at 520 nm approximately doubled (Figure 14A).

- To verify that the oligonucleotide modified gold nanoparticles were attached to the oligonucleotide/nanoparticle modified surface through DNA hybridization interactions with the linking oligonucleotide, a melting curve was performed. For the melting experiment, the substrate was placed in a cuvette containing 1 mL of hybridization buffer and the same apparatus used in Example 2, part B, was used. The absorbance signal due to the nanoparticles (520 nm) was monitored as the temperature of the substrate was increased at a rate of 0.5°C per minute. The nanoparticle signal dramatically dropped when the temperature passed 60°C. See Figure 14B. A first derivative of the signal showed a melting temperature of 62°C, which corresponds with the temperature seen for the three DNA sequences hybridized in solution without nanoparticles. See Figure 14B.

Example 7: Assay Using Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates

- The detection system illustrated in Figures 15A-G was designed so that the two probes 1 and 2 align in a tail-to-tail fashion onto a complementary target 4 (see Figures 15A-G). This differs from the system described in Example 5 where the two probes align consecutively on the target strand (see Figures 12A-F).

- The oligonucleotide-gold nanoparticle conjugates 1 and 2 illustrated in Figures 15A-G were prepared as described in Example 3, except that the nanoparticles were redispersed in hybridization buffer (0.3 M NaCl, 10 mM phosphate, pH 7). The final nanoparticle-oligonucleotide conjugate concentration was estimated to be 13 nM by measuring the reduction in intensity of the surface plasmon band at 522 nm which gives rise to the red color of the nanoparticles. The oligonucleotide targets illustrated in

WU 03/166

PCT/US2003/199

Figures 15A-G were purchased from the Northwestern University Biotechnology Facility, Evanston, IL.

When 150 μ L of hybridization buffer containing 13 nM oligonucleotide-nanoparticle conjugates 1 and 2 was mixed with 60 picomoles (6 μ L) of target 4, the solution color immediately changed from red to purple. This color change occurs as a result of the formation of large oligonucleotide-linked polymeric networks of gold nanoparticles, which leads to a red shift in the surface plasmon resonance of the nanoparticles. When the solution was allowed to stand for over 2 hours, precipitation of large macroscopic aggregates was observed. A "melting analysis" of the solution with the suspended aggregates was performed. To perform the "melting analysis", the solution was diluted to 1 mL with hybridization buffer, and the optical signature of the aggregates at 260 nm was recorded at one minute intervals as the temperature was increased from 25°C to 75°C, with a holding time of 1 minute/degree. Consistent with characterization of the aggregate as an oligonucleotide-nanoparticle polymer, a characteristic sharp transition (full width at half maximum, $FW_{1/2}$ of the first derivative = 3.5°C) was observed with a "melting temperature" (T_m) of 53.5°C. This compares well with the T_m associated with the broader transition observed for oligonucleotides without nanoparticles (T_m = 54°C, $FW_{1/2}$ = 13.5°C). The "melting analysis" of the oligonucleotide solution without nanoparticles was performed under similar conditions as the analysis with nanoparticles, except that the temperature was increased from 10-80°C. Also, the solution was 1.04 μ M in each oligonucleotide component.

To test the selectivity of the system, the T_m for the aggregates formed from the perfect complement 4 of probes 1 and 2 was compared with the T_m 's for aggregates formed from targets that contained one base mismatches, deletions, or insertions (Figures 15A-G). Significantly, all of the gold nanoparticle-oligonucleotide aggregates that contained imperfect targets exhibited significant, measurable destabilization when compared to the aggregates formed from the perfect complement, as evidenced by T_m values for the various aggregates (see Figures 15A-G). The solutions containing the

WU 618165

PCY20001199

imperfect targets could easily be distinguished from the solution containing the perfect complement by their color when placed in a water bath held at 52.5°C. This temperature is above the T_m of the mismatched polymers, so only the solution with the perfect target exhibited a purple color at this temperature. A 'melting analysis' was also

- 5 performed on the probe solution which contained the half-complementary target. Only a minute increase in absorbance at 260 nm was observed.

- Next, 2 μ L (20 picomoles) of each of the oligonucleotide targets (Figures 15A-C) were added to a solution containing 50 μ L of each probe (13 nM) in hybridization buffer. After standing for 15 minutes at room temperature, the solutions were transferred to a temperature-controlled water bath and incubated at the temperatures indicated in Table 4 below for five minutes. A 3 μ L sample of each reaction mixture was then spotted on a C-18 silica plate. Two control experiments were performed to demonstrate that the alignment of both probes onto the target is necessary to trigger aggregation and, therefore, a color change. The first control experiment consisted of both probes 1 and 2 without target present. The second control experiment consisted of both probes 1 and 2 with a target 3 that is complementary to only one of the probe sequences (Figure 15B). The results are presented in Table 4 below. Pink spots signify a negative test, and blue spots signify a positive test.

- Notably, the colorimetric transition that can be detected by the naked eye occurs over less than 1°C, thereby allowing one to easily distinguish the perfect target 4 from the targets with mismatches (5 and 6), an end deletion (7), and a one base insertion at the point in the target where the two oligonucleotide probes meet (8) (see Table 4). Note that the colorimetric transition T_c is close in temperature, but not identical, to T_m . In both controls, there were no signs of particle aggregation or instability in the solutions, as evidenced by the pinkish red color which was observed at all temperatures, and they showed negative spots (pink) in the plate test at all temperatures (Table 4).

The observation that the one base insertion target 8 can be differentiated from the fully complementary target 4 is truly remarkable given the complete complementarity of

WU 01/05165

FCT/USMLB1199

- the insertion strand with the two probe sequences. The denaturation of the aggregate formed from 8 and the nanoparticle probes appears to be due to the use of two short probes and the loss of base stacking between the two thymidine bases where the probe tails meet when hybridized to the fully complementary target. A similar effect was observed when a target containing a three base pair insertion (CCC) was hybridized to the probes under comparable conditions, ($T_m = 21^\circ\text{C}$). In the system described above in Example 5, targets with base insertions could not be distinguished from the fully complementary target. Therefore, the system described in this example is very favorable in terms of selectivity. This system also exhibited the same sensitivity as the system described in Example 5, which is approximately 10 femtomoles without amplification techniques

- The results indicate that any one base mismatch along the target strand can be detected, along with any insertions into the target strand. Importantly, the temperature range over which a color change can be detected is extremely sharp, and the change occurs over a very narrow temperature range. This sharp transition indicates that there is a large degree of cooperativity in the melting process involving the large network of colloids which are linked by the target oligonucleotide strands. This leads to the remarkable selectivity as shown by the data.

20

TABLE 4

Reactants (probes) + target	Results (color)					
	RT	47.0°C	50.5°C	61.4°C	62.3°C	64.6°C
(1 + 2)	pink	pink	pink	pink	pink	pink
(1 + 2) + 3	pink	pink	pink	pink	pink	pink
(1 + 2) + 4	blue	blue	blue	blue	blue	pink
(1 + 2) + 5	blue	blue	blue	pink	pink	pink
(1 + 2) + 6	blue	pink	pink	pink	pink	pink
(1 + 2) + 7	blue	blue	blue	blue	pink	pink
(1 + 2) + 8	blue	blue	pink	pink	pink	pink

WU 015105

PC7/2/25/01/1/00

Example 8: Assays Using Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates

A set of experiments were performed involving hybridization with "litter" duplex oligonucleotides. Nanoparticle-oligonucleotide conjugates 1 and 2 (illustrated in Figure 16A) were incubated with targets of different lengths (24, 48 and 72 bases in length) and complementary filler oligonucleotides, as illustrated in Figures 16A-C. Otherwise, the conditions were as described in Example 7. Also, the oligonucleotides and nanoparticle oligonucleotide conjugates were prepared as described in Example 7.

- As expected, the different reaction solutions had markedly different optical properties after hybridization due to the distance-dependent optical properties of the gold nanoparticles. See Table 5 below. However, when these solutions were spotted onto a C-18 TLC plate, a blue color developed upon drying at room temperature or 80°C, regardless of the length of the target oligonucleotide and the distance between the gold nanoparticles. See Table 5. This probably occurs because the solid support enhances aggregation of the hybridized oligonucleotide-nanoparticle conjugates. This demonstrates that by spotting solutions onto the TLC plate, the distance between the gold nanoparticles can be substantial (at least 72 bases), and colorimetric detection is still possible.

TABLE 5

Target Length	Results (Color)	
	Solution	TLC Plate
24 bases	Blue	Blue
48 bases	Pink	Blue
72 bases	Pink	Blue
Probe 1 + 2 only	Pink	Pink

20

The color changes observed in this and other examples occur when the distance between the gold nanoparticles (the nanoparticle *distance*) is approximately the same or less than the diameter of the nanoparticles. Thus, the size of the nanoparticles, the size of

WO 01/01665

PC/T/US00/1190

the oligonucleotides attached to them, and the spacing of the nanoparticles when they are hybridized to the target nucleic acid affect whether a color change will be observable when the oligonucleotide-nanoparticle conjugates hybridize with the nucleic acid targets to form aggregates. For instance, gold nanoparticles with diameters of 13 nm will produce a color change when aggregated using oligonucleotides attached to the nanoparticles designed to hybridize with target sequences 10-35 nucleotides in length. The spacing of the nanoparticles when they are hybridized to the target nucleic acid adequate to give a color change will vary with the extent of aggregation, as the results demonstrate. The results also indicate that the solid surface enhances further aggregation of already aggregated samples, bringing the gold nanoparticles closer together.

The color change observed with gold nanoparticles is attributable to a shift and broadening of the surface plasmon resonance of the gold. This color change is unlikely for gold nanoparticles less than about 4 nm in diameter because the lengths of the oligonucleotides necessary for specific detection of nucleic acid would exceed the nanoparticle diameter.

Example 9: Assays Using Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates

Five microliters of each probe 1 and 2 (Figure 12A) were combined to a final concentration of 0.1 M NaCl with buffer (10 mM phosphate, pH 7), and 1 microliter of human urine was added to the solution. When this solution was frozen, thawed, and then spotted on a C-18 TLC plate, a blue color did not develop. To a similar solution containing 12.5 microliters of each probe and 2.5 microliters of human urine, 0.25 microliters (10 picomoles) of target 3 (Figure 12A) was added. The solution was frozen, thawed and then spotted onto a C-18 TLC plate, and a blue spot was obtained.

Similar experiments were performed in the presence of human saliva. A solution containing 12.5 microliters of each probe 1 and 2 and 0.25 microliters of target 3 was heated to 70°C. After cooling to room temperature, 2.5 microliters of a saliva solution (human saliva diluted 1:10 with water) was added. After the resultant solution was

WU 610365

FCTDUSHLD1398

frozen, thawed and then spotted onto a C-18 TLC plate, a blue spot was observed, indicating hybridization of the probes with the target. In control experiments with no target added, blue spots were not observed.

5 Example 10: Assays Using Nucleoside-Oligonucleotide Conjugates

- An assay was performed as illustrated in Figure 13A. First, glass microscope slides, purchased from Fisher scientific, were cut into approximately 5 x 15 mm pieces, using a diamond tipped scribbling pen. Slides were cleaned by soaking for 20 minutes in a solution of 4 l H₂SO₄:H₂O₂ at 50°C. Slides were then rinsed with copious amounts of water, then ethanol, and dried under a stream of dry nitrogen. Thiol-modified DNA was adsorbed onto the slides using a modified procedure reported in the literature (Christey et al., *Nucleic Acids Res.*, 24, 3031-3039 (1996) and Christey et al., *Nucleic Acids Res.*, 24, 3040-3047 (1996)). First, the slides were soaked in a 1% solution of triethoxysilylpropyldimethylamine (DETA, purchased from United Chemical Technologies, Bristol, PA) in 1 mM acetic acid in Nanopure water for 20 minutes at room temperature. The slides were rinsed with water, then ethanol. After drying with a dry nitrogen stream, the slides were baked at 120°C for 5 minutes using a temperature-controlled heating block. The slides were allowed to cool, then were soaked in a 1 mM succinimidyl 4-(maleimidobenzyl)-butyrate (SMPB, purchased from Sigma Chemicals) solution in 80:20 methanol:dioxetoxysulfonide for 2 hours at room temperature. After removal from the SMPB solution and rinsing with ethanol, amine sites that were not coupled to the SMPB crosslinker were capped as follows. First, the slides were soaked for 5 minutes in a 8:1 THF:pyridine solution containing 10% 1-methyl imidazole. Then the slides were soaked in 9:1 THF:acetic anhydride solution for five minutes. These capping solutions were purchased from Glen Research, Sterling, VA. The slides were rinsed with THF, then ethanol, and finally water.
- 15
20
25

DNA was attached to the surfaces by soaking the modified glass slides in a 0.2 OD (1.7 μM) solution containing linearly purified oligonucleotide (3' thiol

WO 03/01665

PCT/DK00/01310

ATGCTCAACTCT [SEQ ID NO:33]). After 12 hours of soaking time, the slides were removed and rinsed with water.

To demonstrate the ability of an analyte DNA strand to bind nanoparticles to the modified substrate, a linking oligonucleotide was prepared. The linking oligonucleotide was 24 bp long (5' TACGAGTTGAGAATCTGAAATGCC [SEQ ID NO:34]) with a sequence containing a 12 bp end that was complementary to the DNA already adsorbed onto the substrate surface. The substrate was then soaked in a hybridization buffer (0.5 M NaCl, 10 mM phosphate buffer pH 7) solution containing the linking oligonucleotide (0.4 OD, 1.7 μ M) for 12 hours. After removal and rinsing with similar buffer, the substrate was soaked in a solution containing 13 nm diameter gold nanoparticles which had been modified with an oligonucleotide (TAGGACTTACGC 5' thiol [SEQ ID NO:35]) that is complementary to the unhybridized portion of the linking oligonucleotide attached to the substrate. After 12 hours of soaking, the substrate was removed and rinsed with the hybridization buffer. The glass substrate's color had changed from clear and colorless to a transparent pink color. See Figure 19A.

Additional layers of nanoparticles were added to the slides by soaking the slides in a solution of the linking oligonucleotide as described above and then soaking in a solution containing 13 nm gold nanoparticles having oligonucleotides (5' thiol ATGCTCAACTCT [SEQ ID NO:33]) attached thereto. After soaking for 12 hours, the slides were removed from the nanoparticle solution and rinsed and soaked in hybridization buffer as described above. The color of the slide had become noticeably more red. See Figure 19A. A final nanoparticle layer was added by repeating the linking oligonucleotide and nanoparticle soaking procedures using 13 nm gold nanoparticles which had been modified with an oligonucleotide (TAGGACTTACGC 5' thiol [SEQ ID NO:35]) as the final nanoparticle layer. Again, the color darkened, and the UV-vis absorbance at 520 nm increased. See Figure 19A.

To verify that the oligonucleotide modified gold nanoparticles were attached to the oligonucleotide modified surface through DNA hybridization interactions with the

WO 03/05165

ECT/SH/01/170

linking oligonucleotide, a melting curve was performed. For the melting experiment, a slide was placed in a cuvette containing 1.5 mL of hybridization buffer, and an apparatus similar to that used in Example 2, part B, was used. The absorbance signal due to the nanoparticles (520 nm) was monitored at each degree as the temperature of the substrate

- 5 was increased from 20°C to 80°C, with a hold time of 1 minute at each integral degree. The nanoparticle signal dramatically dropped when the temperature passed 52°C. See Figure 19B. A first derivative of the signal showed a melting temperature of 55°C, which corresponds with the temperature seen for the oligonucleotide-nanoparticle conjugates and linking oligonucleotides hybridized in solution. See Figure 19B.

10 **Example 11: Assay of a Polynucleotide Using Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates as Probes**

The previous Examples utilized oligo-deoxyoligonucleotides as targets in the assays. The present example demonstrates that the nanoparticle-oligonucleotide

- conjugates can also be used as probes in assaying a polynucleotide. The experiment was carried out by adding 1 µL of a solution of poly(A) (0.004 A₂₆₀ Units) to 100 µL of 15 gold nanoparticles (~10 nM in particles) conjugated to dT₂₀ (a 20-mer oligonucleotide containing thymidylate residues) through a mercaptoalkyl linker at the 5'-terminus. The conjugation procedure was that described in Example 3. Following freezing in a Dry Ice/isopropanol alcohol bath, thawing at room temperature, and spotting on a C18 TLC 20 plate as described in Example 4, a blue spot characteristic of aggregation of the nanoparticles by hybridization was observed. Control experiments carried out in absence of the target gave a pink spot, rather than a blue spot.

25 **Example 12: Assay for Protective Antigen DNA Segment of Anthrax Using Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates**

In many cases amplification of a double-stranded DNA target by PCR is needed to provide sufficient material for an assay. The present example demonstrates that the nanoparticle-oligonucleotide conjugates can be used to assay for a DNA strand in the presence of its complement (i.e., assaying for a single strand after thermal

WU-050445

PCTUSL01150

dehybridization of a double-stranded target) and can recognize and specifically bind to an amplicon obtained from a PCR reaction.

A PCR solution containing a 141 base pair duplex amplicon of the Protective Antigen segment of *Anthrax* was provided by the Navy (sequence given in Figure 23).

- 5 The assay for this amplicon was carried out by isolating the DNA from 100 μ L of the PCR solution using a Qiaquick Nucleotide Removal Kit (Qiagen, Inc., Santa Clarita, CA) and the standard protocol for this kit, with the exception that elution of the DNA was effected with 10 mM phosphate buffer at pH 8.5, rather than with the buffer provided with the kit. The eluent was then evaporated to dryness on a Speed Vac (Savant). To this
 - 10 residue was added 5 μ L of a master mix prepared by mixing equal volumes of each of two solutions of two different oligonucleotide-nanoparticle probes (see Figure 23). Each oligonucleotide-nanoparticle probe was prepared as described in Example 3. The solutions of the probes which were combined to form the master mix were prepared by adding 10 μ L of 2 M NaCl and 5 μ L of oligonucleotide blocker solution (20 pmoles of each blocker oligonucleotide (see Figure 23 and below) in a 0.3 M NaCl, 10 mM
 - 15 phosphate, pH 7.0, solution) to 5 μ L of full-length (about 10 nM) nanoparticle-oligonucleotide solution. The amplicon-probe mixture was heated to 100°C for 3 minutes, then frozen in a DRY ICE ethanol bath and allowed to come to room temperature. A small aliquot (2 μ L) was spotted on a C18 TLC plate and allowed to dry.
 - 20 A strong blue spot indicative of hybridization was obtained.
- Control tests carried out in the same manner in absence of the amplicon target DNA, in the absence of Probe 1, in the absence of Probe 2, or in the absence of the sodium chloride, were all negative, that is, gave a pink spot. Similarly a test carried out using probes 1 and 2 with a PCR amplicon derived from the Lethal Factor segment of
- 25 *Anthrax* in place of the Protective Antigen Segment was negative (pink spot). These controls confirmed that both probes were essential, that salt conditions appropriate for hybridization were needed, and that the test was specific for the specified target sequence.

WO 01/01165

PC7US001/110

The oligonucleotide Blockers were added to inhibit binding of the second strand of the initial duplex target (i.e., the strand complementary to the target strand) to regions of the target nucleic acid strand outside the segments that binds to the probes (see Figure 23 for sequences), since such binding interferes with binding of the nanoparticle

- 5 oligonucleotide probes to the target strand. In this example, the Blocker oligonucleotides were complementary to the single-stranded target in regions not covered by the probes. An alternative scheme is to use blocker oligonucleotides that are complementary to the PCR complementary strand (the strand complementary to the target strand) outside the region that competes with the probe oligonucleotides

10

Example 12: Direct assay of PCR amplicons without isolation of the amplicons from the PCR solution

- The procedure described in Example 12 involved separation of the PCR amplicon from the PCR solution before addition of the nanoparticle-oligonucleotide probes. For many purposes it would be desirable to be able to carry out the assay directly in the PCR solution without preliminary isolation of the polynucleotide products. A protocol for such an assay has been developed and is described below. This protocol has been performed successfully with several PCR products derived under standard conditions using a

15

GeneAmp PCR Reagent Kit with AmpliTaq DNA polymerase. To 50 μ L of the PCR sample solution, 5 μ L of a mixture of two gold nanoparticle-oligonucleotide probes (0.008 AU units of each) was added, followed by addition of a solution made up from 1 μ L of Blocker oligonucleotides (10 pmoles each), 5 μ L of 5 M NaCl, and 2 μ L of 150 mM MgCl₂. This mixture was heated for 2 minutes at 100°C to separate the strands of the duplex target, the tube was immersed directly in a cold bath (e.g., Dry Ice/ethanol) for 2 minutes, then removed, and the solution allowed to thaw at room temperature (the freeze-thaw cycle facilitates hybridization of the probes with the target oligonucleotide). Finally, a few μ L of the solution were spotted on a plate (e.g., C18 RP TLC plate, a silica plate, a nylon membrane, etc.). As usual, blue color

20

25

WO 01/61658

PCT/US98/1190

signifies the presence of the targeted nucleic acid in the PCR solution, a pink color is negative for this target.

5 **Example 14: Direct Recognition of Duplex Oligonucleotides Without Dehybridization, Using Assembly of Nanoparticle-Oligonucleotide Conjugates**

In the previous Examples, double stranded targets were dehybridized by heating to generate single strands which interacted with single-stranded oligonucleotide probes bound to nanoparticles. The present example demonstrates that in cases where triple-stranded complexes can form, double stranded oligonucleotide sequences can be recognized by the nanoparticle probes without prior dehybridization of the target.

10 Tests were carried out with two different cytosine-polyA-polyU and dA₂₀dT₂₀ by adding 1 μ L of a solution containing 0.8 A₂₀ U₂₀ of the target duplex in 100 μ L of buffer (0.1 M NaCl, 10 mM phosphate, pH 7.0) to 100 μ L of a colloidal solution of Au-sT₂₀ nanoparticle-oligonucleotide conjugate (~10 nM in particles; see Example 11) in 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate buffer at pH 7.0. Subsequent quick freezing by immersing the tube in a Dry Ice/acetone bath and thawing by removing the tube from the bath and letting it stand at room temperature (23°C), followed by spotting 3 μ L of the solution on a C18 TLC plate, afforded a blue spot characteristic of hybridization and aggregation of the nanoparticles.

20 The rationale for this test is that the nanoparticle probe (bearing pyrimidine oligonucleotides in this example) bind in a sequence specific manner at purine oligonucleotide/pyrimidine oligonucleotide sites along the duplex target. Since many binding sites are available on each double stranded entity, the binding leads to formation of an aggregate of nanoparticles. The results show that this assay, based on formation of triple-stranded complexes involving the nanoparticle probes, works both for oligonucleotide and oligodeoxynucleotide double-stranded targets.

25 **Example 15: Assay Based on Both Fluorescence And Colorimetric Detection**

WU 01/05/05

PCT/US00/0190

All hybridization experiments were performed in a 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate, pH 7.0, buffer solution. AcetatePlus™ filtration membranes (0.45 µm) were purchased from Micron Separations Inc., Westboro, MA. Amino-terminated latex microspheres (3.1 µm) were purchased from Bangs Laboratories, Fishers IN.

- 5 Fluorophore-labeled oligonucleotides functionalized with alkyamine groups at the 3' terminus were synthesized using standard phosphoramidite chemistry (Eckstein, ed., in *Oligonucleotides and Analogues*, 1st ed., Oxford University, New York, N.Y. 1991) with an Amino-Modifier C7 CPG solid support (Glen Research) and a 5'-fluorescein phosphoramidite (6-FAM, Glen Research) on an Expedite 8909 synthesizer and were
- 10 purified by reverse phase HPLC. They were attached to the amino-functionalized latex microspheres by means of disulfide coupling to yield a disulfide linkage as described in Chazotte et al., *Langmuir*, 13, 3103-3110 (1997). Briefly, a DMF solution of a one thousand fold excess of 1,4-phenylene disulfide was added to an aqueous borate buffer solution (0.1 M, pH 9.3) of the amino-modified oligonucleotide. After
- 15 several hours, the excess 1,4-phenylene disulfide was extracted with butanol and the aqueous solution lyophilized. The activated oligonucleotides were redissolved in borate buffer and reacted with the amino-functionalized latex microspheres in a carbonate buffer (0.1 M, pH 9.3, 1 M NaCl). After 12 hrs, the particles were isolated by centrifugation and washed three times with buffered saline solution (0.3 M NaCl, 10 mM
- 20 phosphate pH 7.0). The 5'-oligonucleotide-modified gold nanoparticle probes were prepared as described in Example 3.

The target oligonucleotide (1-5 µl, 3 nM) was added to 3 µl of fluorophore-labeled oligonucleotide-modified latex microsphere probe solution (3.1 µm; 100 nM). After 5 minutes, 3 µl of the 5' oligonucleotide-modified gold nanoparticle probe solution

- 25 (13 µm; 5 nM) were added to the solution containing the target and latex microsphere probes. Upon standing for an additional 10 minutes, the solution containing both probes and target was vacuum-filtered through the AcetatePlus membrane. The membrane retained the relatively large latex particles and allowed any non-hybridized gold

WO 01/5655

PC/TROSHI/P02

nanoparticle probes to pass through. In the presence of a sufficient concentration of target, the latex microspheres and the gold nanoparticles hybridized with the target, and a red spot was observed on the membrane (positive result). A control experiment was always carried out where the aliquot of solution containing the target oligonucleotide was replaced by an equal volume of water. In this case, a white spot was left on the membrane (negative result). For a 24-base pair model system, using the unaided eye, 3 femtomoles of target oligonucleotide could be detected colorimetrically.

A double-stranded target oligonucleotide (1-5 μ l, 20 nM), 3 μ l of a solution of fluorophore-labeled-oligonucleotide-latex microspheres (3.1 μ m; 100 mM) and 3 μ l of a solution of 9'-oligonucleotide-gold nanoparticles (13 nm; 8 nM) were combined and heated to 100 °C for 3 minutes. Then, the solution was immediately frozen by immersing the reaction vessel containing it in a liquid N₂ bath for 3 minutes. This solution was then thawed at room temperature and filtered as described above. For a 24-base pair model system, using the unaided eye, 20 femtomoles of duplex target oligonucleotide could be detected colorimetrically.

When monitored by fluorescence, the detection method described above proved to be difficult due to background fluorescence from the membrane. This problem was overcome by "washing" the latex microspheres by centrifugation to remove excess gold nanoparticle probes before spotting an aliquot on a reverse-phase TLC plate. The hybridization experiments were performed as described above. After hybridization was effected between the probes and target, 10 μ l of buffer were added to the solution, which was subsequently centrifuged at 16,000 x g for 2 minutes. The supernatant was removed, and 5 μ l of buffer were added to help resuspend the precipitate. A 3 μ l aliquot was then spotted on a reverse-phase TLC plate. For both single-stranded and duplex target oligonucleotides, 25 femtomoles could be detected colorimetrically by the naked eye. Fluorescent spots could be visualized by the naked eye with a hand-held UV-lamp until the target amount in the 3 μ l aliquot used to form the spot was as low as 50 femtomoles. It is believed that optimization of this system will allow for detection of even lower

WO 01/51165

PCT/US99/0190

amounts of target nucleic acid.

Example 16: Assay Enriching Silver Staining

- DNA hybridization tests on oligonucleotide-modified substrates are commonly used to detect the presence of specific DNA sequences in solution. The developing promise of combinatorial DNA arrays for probing genetic information illustrates the importance of these heterogeneous sequence assays to future science. In most assays, the hybridization of fluorophore-labeled targets to surface-bound probes is monitored by fluorescence microscopy or densitometry. Although fluorescence detection is very sensitive, its use is limited by the expense of the experimental equipment and by background emissions from most common substrates. In addition, the selectivity of labeled oligonucleotide targets for perfectly complementary probes over those with single-base mismatches is poor, precluding the use of surface hybridization tests for detection of single nucleotide polymorphisms. A detection scheme which improved upon the simplicity, sensitivity and selectivity of fluorescent methods could allow the full potential of combinatorial sequence analysis to be realized. The present invention provides such improved detection schemes.

- For instance, oligonucleotide-modified gold nanoparticles and unmodified DNA target could be hybridized to oligonucleotide probes attached to a glass substrate in a three-component sandwich assay (see Figures 25A-B). Note that the nanoparticles can either be individual ones (see Figure 25A) or "trees" of nanoparticles (see Figure 25B). The "trees" increase signal sensitivity as compared to the individual nanoparticles, and the hybridized gold nanoparticles "trees" often can be observed with the naked eye as dark areas on the glass substrate. When "trees" are not used, or to amplify the signal produced by the "trees," the hybridized gold nanoparticles can be treated with a silver staining solution. The "trees" accelerate the staining process, making detection of target nucleic acid faster as compared to individual nanoparticles.

The following is a description of one specific system (illustrated in Figure 25A).

WO 01/0165

PC/D00000100

- Capture oligonucleotides (5'-HS(CH₂)₆-A₁₀ATGCTCAACTCT; SEQ ID NO: 43) were immobilized on a glass substrate as described in Example 10. A target oligonucleotide (5'-TAOAGTTGAGATCCTGAATGCG-3'; SEQ ID NO: 44, concentrations given below in Table 6 for each experiment) was hybridized with the capture oligonucleotides in 0.3 M NaCl, 10 mM phosphate buffer as described in Example 10. The substrate was rinsed twice with the same buffer solution and immersed in a solution containing gold nanoparticle probes functionalized with target-complementary DNA (5'-HS(CH₂)₆A₁₀CCGATTCAAGCAT; SEQ ID NO: 45) (preparation as described in Example 3) for 12 hours. Next, the substrate was rinsed copiously with 0.3 M NaNO₃ to remove Cl⁻.
- The substrate was then developed with silver staining solution (1:1 mixture of Silver Enhancer Solutions A and B, Sigma Chemical Co., # S-5020 and # S-5145) for 3 minutes. Greyscale measurements were made by scanning the substrate on a flatbed scanner (normally used for scanning documents into a computer) linked to a computer loaded with software capable of calculating greyscale measurements (e.g., Adobe Photoshop). The results are presented in Table 6 below.

TABLE 6

Target DNA Concentration	Mean Greyscale	Standard Deviation
10 nM	47.27	2.10
5 nM	53.46	0.64
2 nM	54.59	1.17
1 nM	59.95	1.62
500 pM	61.61	2.28
250 pM	60.05	3.71
100 pM	59.04	2.04
50 pM	135.20	7.49
20 pM	155.39	3.65
None (control)	159.16	10.03

WO 01/01555

PC/TUSHER/155

Example 17: Assemblies Containing Quantum Dots

This example describes the immobilization of synthetic single-stranded DNA on semiconductor nanoparticle quantum dots (QDs). Native CdSe/ZnS core/shell QDs (~4 nm) are soluble only in organic media, making direct reaction with alkylthiol-terminated single-stranded DNA difficult. This problem was circumvented by first capping the QDs with 3-mercaptopropionic acid. The carboxylic acid group was then deprotonated with 4-(dimethylamino)pyridine, rendering the particles water soluble, and facilitating reaction of the QDs with either 3'-propylthiol- or 5'-hexylthiol-modified oligonucleotide sequences. After DNA modification, the particles were separated from unreacted DNA by dialysis. A "linker" DNA strand was then hybridized to surface-bound sequences, generating extended assemblies of nanoparticles. The QD assemblies, which were characterized by TEM, UV/Visible spectroscopy, and fluorescence spectroscopy, could be reversibly assembled by controlling the temperature of the solution. The temperature dependent UV-Vis spectra were obtained for the novel QD assemblies and composite aggregates formed between QDs and gold nanoparticles (~13 nm).

A. General Methods

Nanopure water (18.1 M Ω) prepared using a NANOpure ultrapure water purification system was employed throughout. Fluorescence spectra were obtained using a Beckman Fluor 50 B Luminescence Spectrometer. Melting analyses were performed using a HP 8453 diode array spectrophotometer equipped with a HP 9090b Peltier Temperature Controller. Centrifugation was carried out using either an Eppendorf 5415C centrifuge or a Beckman Avanti 30 centrifuge. TEM images were acquired using a Hitachi HF-2000 field emission TEM operating at 200 kV.

B. Preparation Of Oligonucleotide-QD Conjugates

Synthetic methacrylates for semiconductor quantum dots (QDs) have improved greatly in recent years, and for some materials, most notably CdSe, monodisperse samples of pre-determined size can now be prepared with relative ease. Murray et al., *J.*

WO 00/51445

PCT/DUS/00/01910

- Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 8706; Hines, et al., *J. Phys. Chem.* 1996, 100, 468. As a result, the unique electronic and luminescent properties of these particles have been studied extensively (see, Alivisatos, *J. Phys. Chem.* 1996, 100, 13226, and references therein; Klein et al., *Nature* 1997, 699; Kano et al., *J. Chem. Phys.* 1997, 106, 5869;
- 5 Niemal et al., *Nature* 1996, 383, 802, potentially paving the way for QDs to be employed in diverse technologies, such as light-emitting diodes (Schlump et al., *J. Appl. Phys.* 1997, 82, 5837; Dabbousi et al., *Appl. Phys. Lett.* 1995, 66, 1316) and as non-radioactive biological labels (Frustez et al., *Science* 1998, 281, 2013; Chan et al., *Science* 1996, 287, 2016). However, many applications will require that the particles be arranged spatially
- 10 on a surface or organized into three-dimensional materials (Vossmeier et al., *J. Appl. Phys.* 1998, 84, 3664). Moreover, the ability to organize one or more types of nanoparticles into superlattice structures (Murray et al., *Science* 1995, 270, 1335) would allow for the construction of completely new types of hybrid materials with new and potentially interesting and useful properties.
- 15 DNA is the ideal system for programming the assembly of nanoscale building blocks into periodic two- and three-dimensional extended structures. The many attributes of DNA, which include ease of synthesis, extraordinary binding specificity, and virtually unlimited programmability by virtue of nucleotide sequence, can be exploited for the use of QD assembly.
- 20 The modification of QDs with DNA has proven to be more difficult than for gold nanoparticles. The common methods for preparing highly luminescent CdSe QDs yield materials that are coated with a mixture of triethylphosphine oxide (TOPO) and triethylphosphine (TOP). As a result, these QDs are soluble only in non-polar solvents, making them difficult to functionalize with highly charged DNA strands by direct
- 25 reaction. This difficulty has been overcome by the method described below, which is the first successful modification of semiconductor nanoparticles with single-stranded DNA. It should be noted that others, in elegant studies, have looked at the interactions between QDs and duplex DNA, but these studies did not make use of the sequence specific

WO 0401665

PCYUSRI/RI 194

binding properties of DNA to direct the assembly of extended QD structures. Coffey et al., *Appl. Phys. Lett.* 1996, 69, 3851; Mahab et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1996, 118, 7025.

Since the surface of CdSe/ZnS core/shell QDs binds organic thiols, it was desired to modify these semiconductor particles with alkylthiol-terminated DNA strands by a substitution reaction. The lack of water solubility of these QDs, though, hindered such an approach. Two different methods recently have been reported for making QDs water soluble, allowing for the immobilization of protein structures on the QD surfaces. One involves encapsulation of the core/shell structures with a silica layer (Bruchez et al., *Science* 1998, 281, 2013), while the other utilizes mercaptoacetic acid both to stabilize the particles and provide water solubility (Chan et al., *Science* 1998, 281, 2016). The procedure described in this example, which produces remarkably stable colloid under DNA hybridization conditions, utilizes 3-mercaptopropionic acid to passivate the QD surface.

An excess of 3-mercaptopropionic acid (0.10 mL, 1.15 mmol, Aldrich) was added by syringe to a suspension of ~20 mg of TOP/TOPO stabilized CdSe/ZnS QDs (prepared as described in Hines, et al., *J. Phys. Chem.* 1996, 100, 668) in 1.0 mL of N,N-dimethyl formamide (DMF; Aldrich) generating a clear, dark orange solution containing 3-mercaptopropionic acid functionalized QDs. The reaction occurred quickly. For subsequent reactions, excess 3-mercaptopropionic acid was not removed, and the particles were stored at room temperature in DMF.

However, to characterize the QDs, a portion of the sample was purified by removing unreacted 3-mercaptopropionic acid as follows. A 0.50 mL sample was centrifuged (4 hours at 30,000 rpm), and the supernatant was removed. The remaining solution was washed with ~0.3 mL of DMF and recentrifuged. This step was repeated two additional times before recording the FTIR spectrum. FTIR (polyethylene cmd, 36): 1710 cm⁻¹ (s), 1472 cm⁻¹ (m), 1278 cm⁻¹ (w), 1189 cm⁻¹ (m), 1045 cm⁻¹ (w), 993 cm⁻¹ (m), 946 cm⁻¹ (w), 776 cm⁻¹ (m), 671 cm⁻¹ (m). Unlike the TOP/TOPO stabilized native QDs, the 3-mercaptopropionic acid modified QDs exhibited a characteristic ν_{SH} band at

WO 00/1665

ECT/ESH01/99

1710 cm^{-1} for the surface bound propionic acid.

Although the 3-mercaptopropionic acid modified QDs were practically insoluble in water, their solubility could be significantly enhanced by deprotonating the surface bound mercaptopropionic acid sites with 4-(dimethylamino)pyridine (DMAF, Aldrich) as described in the next paragraph. The QDs then dispersed readily in water, producing orange solutions that were stable for up to a week at room temperature.

- To attach oligonucleotides to QDs, 150 μL (optical density at 530 nm = 21.4) of a solution of the 3-mercaptopropionic acid functionalized particles in DMAF were added to a solution of DMAF (8.0 mg, 0.065 mmol) in 0.4 mL of DMAF. An orange precipitate was formed. It was separated by centrifugation (~30 seconds at 3000 rpm) and then dissolved in 1.0 mL of a solution of 3'-propylthio- or 5'-hexylthio-terminated oligonucleotides (1.0-2.0 OD/mL; prepared as described in Example 1; sequences given below).
- 3'-Propylthio-terminated oligonucleotides were characterized by IR spectroscopy (polyethylene card, 3M). IR (cm^{-1}): 1647 (m), 1539 (s), 1463 (m), 1214 (w), 719 (w), 478 (s). After standing for 12 hours, the oligonucleotide-containing solution was brought to 0.15 M NaCl, and the particles were aged for an additional 12 hours. The NaCl concentration was then raised to 0.3 M, and the mixture was allowed to stand for a further 24-40 hours before dialyzing against PBS (0.3 M NaCl, 10 mM phosphate buffer, pH 7, 0.01% sodium azide) using a 100 kDa membrane (Spectra/Por Cellulose Ester Membrane). The dialysis was carried out over a period of 48 hours, during which time the dialysis bath was refreshed three times.

- Oligonucleotide-QD conjugates prepared in this manner displayed indefinite aqueous stability. Moreover, the colloids remained strongly fluorescent, with a sharp (full width at half maximum (FWHM) = 33 nm), symmetrical emission at 546 nm (indicative of a ~3.2 nm CdSe core; Murray et al., *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115, 8706).

Two different oligonucleotide-QD conjugates were prepared by this protocol and stored in PBS. One was modified with a 22mer, comprised of a propylthiol functionality at the 3'-end, a 12mer capture sequence, and an intervening 10 base (all A) spacer: 5'-

WO 01/51555

PC/D58H/01/00

TCCTCACTCGTAA₁₀-(CH₂)₆-SH (SEQ ID NO: 46). The other employed a 5'-hexynyl-terminated sequence, also with a 10 base (all A) spacer, and a 12mer capture sequence which was non-complementary with the 3'-propynyl sequence: 5'-SH-(CH₂)₆-A₁₀CCGATTCAGGAT-3' (SEQ ID NO: 47).

5 C. Preparation Of QD Assemblies

When approximately equal quantities of these two oligonucleotides (200 μ L, OD₂₆₀=0.224 and 0.206, respectively) were mixed and then combined with 6 μ L (60 pmol) of a solution of a complementary linking 24mer sequence (5'-TACGAGTTGAGAATCCT-GAATGCG-3', SEQ ID NO: 48), QD assemblies formed within 20-30 minutes at room temperature, Figure 26. Faster linking took place when the mixture was frozen (-78° C) and then allowed to warm slowly to room temperature.

The clusters generated were not large enough to settle out of solution. However, they could be separated by centrifugation at relatively low speeds (10,000 RPM for 10 min), as compared with the unlinked particles (30,000 RPM for 2-3 hours).

The decrease in fluorescence upon hybridization was determined by integration of the fluorescence signal (320 nm excitation wavelength) from 475 nm to 625 nm of 4 pairs of samples. Each pair was prepared in the following manner. A solution of 3' propynyl-terminated DNA-modified particles (30 μ L, optical density at 530 nm = 0.224) was combined with a solution of 5' hexynyl-terminated DNA-modified QDs (30 μ L, optical density at 530 nm = 0.206) in an Eppendorf centrifuge tube, and then diluted with 140 μ L of PBS. The mixture was then split into two equal portions, and complementary "linker" DNA (2 μ L, 30 pmol) was added to one, while non-complementary "linker" DNA (5'-CTACTTAGATCCGAGTCCACAT-3', SEQ ID NO: 49) (2 μ L, 30 pmol) was added to the other. All eight of the samples were then frozen in a dry ice/acetone bath (-78°C), after which they were removed from the bath and allowed to warm slowly to room temperature. To estimate the change in fluorescence efficiency upon hybridization, the fluorescence intensities of the "larger" (complementary "linker") samples were adjusted to account for the difference in

WU 09/51665

ECT/US/01/170

absorbance at 320 nm from the corresponding control samples, which contained non-complementary "linker".

The results showed that hybridization of QD/QD assemblies was accompanied by a decrease in integrated fluorescence intensity by an average of $26.4 \pm 6.1\%$, and a ~ 2 nm red shift of the emission maximum, presumably due to cooperative effects between QDs. Figure 27A. Interestingly, Bawendi, et al. noticed a similar, albeit slightly larger, red shift when compacting the fluorescence of close-packed QDs and widely separated dots isolated in a frozen matrix (Murray et al., Science 1995, 270, 1335). These changes in the fluorescence spectra may be an indication of excimer formation between QDs, but the exact nature of such a complex is still largely a matter of speculation. As expected, no aggregation was observed when the "linker" was missing or not complementary, or when either one of the two types of particles was absent.

The "melting" behavior of the DNA was monitored by observing the UV-Vis spectra of the aggregates as a function of temperature. For this "melting" analysis, the precipitate containing the QD/QD assemblies was centrifuged at 10,000 rpm for 10 minutes, washed with 7 μ L of PBS, recentrifuged, and suspended in 0.7 mL of PBS. The UV/Visible spectroscopic signature of the assemblies was recorded at two degree intervals as the temperature was increased from 25°C to 75°C, with a holding time of 1 minute prior to each measurement. The mixture was stirred at a rate of 500 rpm to ensure homogeneity throughout the experiment. Temperature vs extinction profiles were thus compiled from the extinction at 600 nm. The first derivative of these profiles was used to determine the "melting" temperatures.

The results, Figure 27B ($T_m = 57^\circ\text{C}$), demonstrated conclusively that DNA had been immobilized on the QD surfaces and that hybridization was responsible for the assembly process. The transition also was extremely sharp when compared with DNA alone (FWHM of the respective first derivative: 4°C vs 9°C), which is consistent with the formation of an aggregate structure with multiple DNA links per particle. An increase in extinction was observed upon denaturation, most likely because of a scattering

WU 010165

ECT/US/010165

effect whereby particles in the interior of the assemblies are prevented from absorbing light by the surrounding QDs.

D. Preparation Of QD/Gold Assemblies

- With DNA-functionalized QDs in hand, the assembly of hybrid assemblies made from multiple types of uncoordinated building blocks became feasible. To prepare these hybrid assemblies, a solution of ~ 17 nM 3'-hexylthiol-modified 13 nm gold nanoparticles (30 μ L, ~ 5 nM), prepared as described in Example 3) was mixed with a solution of 3'-hexylthiol-terminated DNA-modified QDs (15 μ L, optical density at 530 nm = 0.206) in an Eppendorf centrifuge tube. "Linker" DNA (5 μ L, 50 pmol) was added, and the mixture cooled to -78°C , and then allowed to warm slowly to room temperature, generating a reddish-purple precipitate. No aggregation behavior was observed unless both types of particles and a complementary target were present. After centrifugation (1 min at 3,000 rpm) and removal of the supernatant, the precipitate was washed with 100 μ L of PBS and resuspended.
- For "melting" analysis, the washed precipitate was suspended in 0.7 mL of PBS. UV-Vis spectroscopy was used to follow the changes in the surface plasmon resonance of the gold nanoparticles, so temperature vs. extinction profiles were compiled at 525 nm. Using the surface plasmon resonance of the gold nanoparticles provides a much more sensitive probe with which to monitor hybridization than does the UV-Vis spectroscopic signature of the QDs alone. Therefore, a "melting" experiment can be performed on a much smaller sample ($\sim 10\%$ of the QD solution is needed), although the intensity of the plasmon band obscures the UV/Vis signal from the QDs. Similar to the pure QD system described above, a sharp (FWHM of the first derivative = 4.5°C) melting transition occurred at 58°C (see Figure 27D).

- High resolution TEM images of these assemblies showed a network of gold nanoparticles interconnected by multiple QDs, Figure 27C. The QDs, which have a much lower contrast in the TEM image than gold nanoparticles, can be identified by their lattice fringes. They are just barely resolvable with the high resolution TEM, but clearly

WU 0151155

PC 7/25/2003/379

indicate the periodic structure of these composite assemblies and the role that DNA plays in forming them.

E. Summary

The results described in this example definitively establish that the immobilization of DNA onto QD surfaces has been achieved and that these particles can now be used in combination with DNA under hybridization conditions. Using DNA-functionalized QDs, the first DNA-directed formation of QD and mixed gold/QD nanoparticle structures has been demonstrated. The successful modification of semiconductor QDs with DNA has significant implications for materials research, and the door is now open for more extensive inquiries into the luminescent, electronic, and chemical properties of these unique building blocks as they are incorporated into new and functional multi-component nanostructures and nanoscale materials.

Example 18: Methods of Synthesizing Oligonucleotide-Nanoparticle Composites And The Composites Produced By The Methods

A. General Methods

$2\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ and tin(II) chloride were purchased from Aldrich chemical company, Milwaukee, WI. Gold wire, 99.999% pure, and titanium wire were purchased from Goldsmith Inc., Evanston, IL. Silanes were (10) with a 1 micron thick oxide layer were purchased from Silicon Quest International, Santa Clara, CA. 5'-thiol-modifier C6-phosphoramidite reagent, 3'-propylthiol modifier CPG, fluorescein phosphoramidite, and other reagents required for oligonucleotide synthesis were purchased from Glen Research, Sterling, VA. All oligonucleotides were prepared using an automated DNA synthesizer (Expedite) using standard phosphoramidite chemistry (Berkstein, T. *Oligonucleotides and Analogs*; 1st ed.; Oxford University Press, New York, 1991). Oligonucleotides containing only 5' hexylthiol modifications were prepared as described in Example 1. 5' and 6'-carboxyfluorescein, succinimidyl ester was purchased from Molecular Probes, Eugene, OR. NAP-5 columns (Sephadex G-25

WO 01/21665

PCT/US98/01701

Medium, DNA grain) were purchased from Pharmacia Biotech. Nanopure H₂O (>18.0 MΩ), purified using a Barnstead NANOpure ultrapure water system, was used for all experiments. An Eppendorf 5413C or a Beckman Avanti 30 centrifuge was used for centrifugation of Au nanoparticle solutions. High Performance Liquid Chromatography

5 (HPLC) was performed using a TSP series 1100 HPLC.

B. Physical Measurements

Electronic absorption spectra of the oligonucleotide and nanoparticle solutions were recorded using a Hewlett-Packard (HP) 8452a diode array spectrophotometer. Fluorescence spectroscopy was performed using a Perkin-Elmer LS50 Decimeter.

10 Transmission Electron Microscopy (TEM) was performed with a Hitachi 8100

Transmission Electron Microscope operating at 200 kV. A Thermo Jarrell Ash AtomScan 25 atomic emission spectrometer with an inductively coupled plasma (ICP) source was used to determine the atomic concentration of gold in the nanoparticle solutions (gold emission was monitored at 242.795 nm).

15 C. Synthesis and Purification of Fluorescently-Labeled
Alkanethiol-Modified Oligonucleotides

Thiol-modified oligonucleotide strands containing either 12 or 32 bases, with 5' hexylthiol and 3' fluorocytosine moieties, were prepared. The sequence of the 12mer (S12F) was HS(CH₂)₆-5'-COC-ATT-CAG-GAT-3'-(CH₂)₆-F (SEQ ID NO:30), and the 32mer (S32F) contained the same 12mer sequence with the addition of a 20-aa spacer

20 sequence to the 5' end (SEQ ID NO:31). The thiol-modified oligonucleotides were prepared as described in Strohrieff et al., *J. Am. Chem. Soc.* 110:1959-1964 (1988). An amino-modifier C7 CPG solid support was used in automated synthesis, and the 5' terminus was initially modified with hexylthiol phosphoramidite, as described

25 previously. The 3' amino, 5' hydroxyl-protected thiol modified oligonucleotides were purified by reverse-phase HPLC using an HP ODS Hypersil column (5 mm, 250 x 4 mm) with 0.03 M triethyl ammonium acetate (TEAA), pH 7 and a 1% / minute gradient of 95% CH₃CN / 5% 0.03 M TEAA at a flow rate of 1 mL/min., while monitoring the UV signal

WU 885165

PCT/US98/0199

of DNA at 254 nm. The retention times of the 5'-S-trityl, 3' amino modified 12-base and 32-base oligonucleotides were 36 and 33 minutes respectively.

The lyophilized product was redispersed in 1 ml of 0.1 M Na₂CO₃ and, while stirring in the dark, 100 µl of 10 mg/ml succinimidyl ester of fluorescein (5,6 FAM-SE, Molecular Probes) in dry DMF was added over 1.5 hours according to the directions of the manufacturer (Molecular Probes literature). The solution was stirred at room

- 5 temperature for an additional 15 hours, then precipitated from 100% ethanol at -20 °C. The precipitate was collected by centrifugation, dissolved in H₂O and the coupled product separated from unreacted amino-terminated oligonucleotide by ion-exchange
- 10 HPLC. A Dionex Nucleopak PA-100 column (250 x 4 mm) was operated with 10 mM NaOH aqueous eluant and a 1% / minute gradient of 1 M NaCl/10mM NaOH at a flow rate of 0.8 mL/minute. Retention times of 5'-S-trityl, 3' fluorescein modified 12mer and 32mer were 30 and 49 minutes respectively. The oligonucleotide product was desalted by reverse-phase HPLC. Removal of the trityl protection group of the fluorescein-
- 15 terminated, trityl oligonucleotide was performed using silver nitrate and dithiothreitol (DTT) as previously described (Strohoff et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120:1959-1964 (1998)). The yield and purity of the oligonucleotides were assessed using the techniques previously described for alkylthiol oligonucleotides (Strohoff et al., *J. Am. Chem. Soc.* 120:1959-1964 (1998)). Oligonucleotides were used immediately after deprotection of
- 20 the thiol group.

Thiol-modified oligonucleotides containing 32 bases, with 3' propylthiol and 5' fluorescein moieties (HS(CH₂)₆-3'-W)-TAG-GAC-TTA-CGC-5'-(CH₂)₆-F, W= A or T) (SEQ ID NO-52) were synthesized on an automated synthesizer using 3' thiol modifier CPGs. The 5' termini of each oligonucleotide was coupled manually to fluorescein phosphoramidite (5-FAM, Glen Research). The modified oligonucleotides were purified by ion exchange HPLC (1% / min gradient of 1 M NaCl, 10 mM NaOH; retention time (Rt) - 48 min (W= T), Rt - 29 min (W= A)). After purification, the oligonucleotide solutions were desalted by reverse phase HPLC. The 3' thiol moieties were deprotected

WU 06/01/05

PCT/JP00/01199

with dithiothreitol by a procedure previously described (Steinoff et al., *J. Am. Chem. Soc.* **120**:1959-1966 (1998)).

D. Synthesis and Purification of Fluorescein Labeled Oligonucleotides.

The fluorophore labeled complement (12F) consisted of 12 bases 3'-GGG-TAA-GTC-CTA-5'-(CH₂)₆-F (SEQ ID NO:53) complementary to the 12mer sequence in S12F and SA₃12F. The oligonucleotide was synthesized using standard methods, and a tyramine-based procedure, similar to the procedure reported above for the 5' alkylthiol modification, was used to couple fluorescein phosphoramidite (6-FAM, Glen Research) to the 5' end of the CPG bound oligonucleotide. Purification was performed using reverse-phase HPLC as above. The fluorescein-labeled oligonucleotide had a retention time of 18 min. The fluorophore labeled complement, 312F (5'-ATC-CTG-AAT-GCG-F, (SEQ ID NO:54)) was prepared using an amino-modifier C7 CPG solid support for automated synthesis, followed by coupling of 5-(6)-carboxyfluorescein succinimidyl ester to the 3' amine using the procedure described above.

E. Preparation and Characterization of Gold Nanoparticles

Gold nanoparticles were prepared by citrate reduction of HAuCl₄ as described in Example 1. Transmission Electron Microscopy (TEM) performed with a Hitachi 8100 TEM was used to determine the size distribution of the resulting nanoparticles. At least 250 particles were sized from TEM negatives using graphics software (ImageTool). The average diameter of a typical particle preparation was 15.7 ± 1.2 nm. Assuming spherical nanoparticles and density equivalent to that of bulk gold (19.30 g/cm^3), an average molecular weight per particle was calculated ($2.4 \times 10^7 \text{ g/mol}$). The atomic gold concentration in a solution of gold nanoparticles was determined by ICP-AES (inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy). A gold atomic absorption standard solution (Albright) was used for calibration. Comparison of atomic gold concentration in the particle solution to the average particle volume obtained by TEM analysis yielded the molar concentration of gold particles in a given preparation, typically $\sim 10 \text{ nM}$. By measuring the UV-vis absorbance of nanoparticle solutions at the surface